

[Technical field] The present invention relates to a recombinant DNA molecule (rDNAs) carrying a structural gene that encodes the human tissue factor heavy chain protein (huTFh). More specifically, this invention relates to an expression vector capable of expressing huTFh in host cells containing that vector. The present invention also relates to a synthetic polypeptide analog of huTFh and monoclonal antibodies that bind huTFh and the polypeptide analogs.

This Page Blank (uspto)

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平1-503438

⑬ 公表 平成1年(1989)11月22日

| | | | | | |
|-------------------------|------|------------|----------|------------|-------------|
| ⑭ Int. Cl. ⁴ | 識別記号 | 庁内整理番号 | 審査請求 未請求 | 予備審査請求 未請求 | 部門(区分) 1(1) |
| C 12 N 15/00 | ZNA | A-8717-4B | | | |
| A 61 K 39/395 | ACB | N-8829-4C | | | |
| C 07 K 7/06 | | Z-8318-4H※ | | | (全 37 頁) |

⑮ 発明の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ポリペプチド及び抗体

⑯ 特 願 昭63-503555

⑰ 翻訳文提出日 昭63(1988)11月30日

⑱ 出 願 昭63(1988)3月29日

⑲ 国際出願 PCT/US88/00998

⑳ 国際公開番号 WO88/07543

㉑ 国際公開日 昭63(1988)10月6日

優先権主張 ㉒ 1987年3月31日 ㉓ 米国(US) ㉔ 033,047

㉕ 発 明 者 エフジグトン トーマス エ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ アヴェ
ス ニド ド ラ ブラヤ 2362

㉖ 出 願 人 スクリップス クリニック ア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ノース
ンド リサーチ ファウンダー トーリー バインズ ロード 10666
シヨン

㉗ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外 8 名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB
(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

最終頁に続く

特許(内容に変更なし)
請求の範囲

- (1) ヒトの組織因子重鎖タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わずかに約12,000ヌクレオチド塩基対を含むDNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の塩基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (3) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約918番の塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(2)記載のDNA断片。
- (4) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約219番の塩基で表わされるアミノ酸残基配列を有する可溶性ヒト組織因子重鎖タンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (5) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約786番の塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(4)記載のDNA断片。
- (6) 上記第1の配列の5'末端に連続し、かつ上記タンパク質のアミノ末端に結合した、アミノ酸残基リダー配列をコードする第2の配列も含み、かつ第1及び第2のDNA配列がヒト組織因子重鎖前駆体タンパク質をコードする混成構造遺伝子を定義する、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (7) 上記混成構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の塩基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(5)記載のDNA断片。
- (8) 上記混成構造遺伝子が、第2図の約34番から約918番の塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(7)記載のDNA断片。
- (9) 上記混成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約219番の塩基で表わされるアミノ酸残基配列を有する、可溶性ヒト組織因子重鎖タンパク質前駆体をコードする、請求の範囲(6)記載のDNA断片。
- (10) 上記混成構造遺伝子が、第2図の約34番から約786番の塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(9)記載のDNA断片。
- (11) ヒト組織因子重鎖タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片に機能的に結合したベクターを含む組換えDNA分子。
- (12) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の塩基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (13) 上記構造遺伝子が、第2図の約130番から約918番の塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (14) さらに、上記第1の断片の5'末端に連続し、かつ上記タンパク質に結合した、アミノ酸残基リダー配列をコードし、かつ第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする混成構造遺伝子を定義する、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (15) 上記混成構造遺伝子が、第1図の約-32番から約263番の塩基で表わされるアミノ酸残基配列に対応するアミノ酸残基配列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (16) 上記混成構造遺伝子が、第2図の約34番から約918番の塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列に対応するヌクレオチ

- F塩基配列を有する、請求の範囲(15)記載の組換えDNA分子。
- (17)上記ベクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を促進しうる、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (18)上記ベクターが、宿主細胞中、上記タンパク質を発現しうる、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (19)上記ベクターが、宿主細胞中、上記前駆体タンパク質を発現しうる、請求の範囲(14)記載の組換えDNA分子。
- (20)上記ベクターが、pKSV-10であり、かつ、上記塩基構造遺伝子が、可溶性の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、第2図の34番から786番の塩基で変えられるスクレオチド配列を有する、請求の範囲(19)記載の組換えDNA分子。
- (21)わずかに約50アミノ酸残基を含み、かつ、

-VNQVYTVQIST-
-LYYWKSSSSGKKT-

からなる群から選ばれた式で表わされる配列に対応するアミノ酸残基を含む、ヒト組織因子結合部位ペプチド類似物。

- (22)上記ポリペプチドが、式：

H-VNQVYTVQIST-OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

- (23)上記ポリペプチドが、式：

H-LYYWKSSSSGKKT-OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

- (24)

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類似物。

- (28)上記抗体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、請求の範囲(26)記載の抗体組成物。
- (29)ヒト組織因子重鎖タンパク質及び第1図の26番から49番の残基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF8-5G9と命名されたハイブリドーマ。
- (30)請求の範囲(29)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (31)ヒト組織因子重鎖タンパク質及び、第1図の第26番から第49番の残基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-10H10と命名された、ハイブリドーマ。
- (32)請求の範囲(31)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (33)ヒト組織因子重鎖及び、第1図の第146番から第167番で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-6B4と命名した、ハイブリドーマ。
- (34)請求の範囲(33)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。
- (35)a)身体サンプルを、ヒト組織因子重鎖タンパク質と混合し、免疫反応混合物を作る；
- b)この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な時間維持する、そして、
- c)ステップb)で生成した免疫反応産物の存在を決定する、以上、a)～c)のステップを含む、体液サンプル中のヒト組織因子重鎖タンパク質の存在を決定する方法。

- (25)

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類似物。

- (26)a)ヒト組織因子重鎖タンパク質と免疫反応し、
b)

からなる群から選ばれた式で表わされるポリペプチドと免疫反応し、かつ

- c)第1図の第204番から第226番の部位で示される式で表わされるポリペプチドと実質的に免疫反応しない、抗体分子を含む、抗体組成物。

- (27)上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲(26)記載の組成物。

- (36)a)生理学的に許容しうる希釈剤及び、血中に存在するヒト組織因子と効率よく免疫反応する、生体内指示手段と結合した、ハイブリドーマTF9-10H10によって産生される、ある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者に静脈投与する；
- b)上記投与を受けた被検者を、上記抗体分子が、血柱の一部として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な、予め決められた時間維持する、そして、
- c)ステップb)で生成した免疫反応産物の存在を決定する、以上、a)～c)のステップを含む生体内の血柱を検出する方法。
- (37)存在するヒト組織因子と効率よく結合する、TF8-5G9及びTF9-6B4からなる群から選んだハイブリドーマによって産生される、ある量の抗体分子を含有する生理学的に許容される希釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検体に静脈投与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の新血因子Ⅷ/Ⅷaへの結合能を中和する方法。
- (38)組成物中、因子Ⅷ/Ⅷaと効率的に結合する量の、

からなる群から選ばれたポリペプチドを、含有する生理学的に許容される希釈剤を含むポリペプチド組成物を被検者に静脈投与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝血因子Ⅷ/Ⅷaへの結合を阻害する方法。

- (39)a)請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージ

を含むサンプル中に存在するヒト組織因子重鎖タンパク質の存在を検定するための、キットの形をした診断システム。

(40) 上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、

a) T F 8-5 G 9、

b) T F 9-6 B 4、

c) T F 9-10 H 10

からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生される、請求の範囲(39)記載の診断システム。

(41) a) サンプルを、固体マトリックスに固定した、請求の範囲

(15)記載のポリペプチドを含む固体サポートと混合し、結合反応混合物とする、

b) 上記結合反応混合物を、上記凝血因子が上記ポリペプチドと結合し、固相複合体及び上清を形成するのに十分な時間維持する、

c) 上記複合体から上記上清を分離する、及び

d) ステップc)の分離した複合体から、上記凝血因子を回収する、

以上、a) ~ d)のステップを含む、サンプルから血液凝固因子Ⅷ/Ⅷaを分離する方法。

(42) 実質的に、ヒト組織因子軽鎖タンパク質を含まない生理学活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質の水溶液を含む組成物。

(43) 上記生理学活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質を、リン脂質中に分散させた、請求の範囲(42)記載の組成物。

(44) 上記溶液が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲(42)記載の組成物。

(45) 上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から第219番の部位で表わされるアミノ酸残基配列を有する、請求の範囲(42)記載の組成物。

(50) 上記遺伝子構造遺伝子が、第2図の第34番から第786番の塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(49)記載の方法。

(51) 請求の範囲(49)記載の方法により産生した、成熟ヒト組織因子重鎖タンパク質を本質的に含む組成物。

(52) 請求の範囲(50)記載の方法により産生した成熟ヒト組織因子重鎖タンパク質を本質的に含む組成物。

(53) ハイブリドーマT F 8-5 G 9により産生される抗体分子を、投与時間内に存在するヒト組織因子と効率よく結合できる量を含む、生理学的に許容された希釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈投与することをを含む、ヒト組織因子の、凝血開始能を中和する方法。

(54) ヒト組織因子重鎖タンパク質及び、第1図の第26番から第49番の残基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、T F 9-5 B 7と命名されたハイブリドーマ。

(55) 請求の範囲(54)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

(56) ハイブリドーマT F 9-5 B 7により産生される抗体分子を含む生理学的に許容された希釈剤を含む治療に効果的な量のモノクローナル抗体組成物を、被検者に投与することをを含む、ヒト組織因子の凝血開始能を中和する方法。

(57) a) ヒト組織因子重鎖タンパク質と免疫反応し、それにより、該タンパク質の因子Ⅷ/Ⅷaへの結合能を阻害し、かつ

b) $h = T F h : \text{Ⅷ} / \text{Ⅷ} a$ 複合体と免疫反応し、それにより、該複合体の因子X活性化能を阻害する抗体分子を含む治療に効果的な量の、抗凝血モノクローナル抗体組成物を投与

する組成物。

(46) a) 少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子軽鎖タンパク質を含まない、生物学活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質の水溶液を含む組成物を含むパッケージ、

を含む血管システム液体サンプル中での凝固能を検定するキットの形をした診断システム。

(47) 上記重鎖タンパク質がリン脂質中に分散している、請求の範囲(46)記載の診断システム。

(48) 上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第1図の第1番から第219番の部位で表わされるアミノ酸残基配列を有する、請求の範囲(46)記載の診断システム。

(49) a) ヒト組織因子重鎖タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ酸残基リダー配列をコードする第2のDNA断片で、第1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前駆体をコードする遺伝子構造遺伝子を定めているDNA断片と遺伝的に結合する、ホ乳細胞に適合する発現ベクターを含む組換えDNA分子でトランスホームしたホ乳細胞の培養地で培養を開始する、

b) 上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そして

c) 上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する、

以上、a) ~ c)のステップを含む、成熟ヒト組織因子重鎖タンパク質の調製方法。

することを含む凝血を阻害する方法。

(58) 上記抗体分子がさらに、ヒト組織因子と免疫反応を起こすことを特徴とする、請求の範囲(57)記載の方法。

特許(内容に変更なし)

明 細 書

ヒトの組織因子に関連するDNA断片・

ポリペプチド及び抗体

(本出願の関連文献)

本出願は、1987年3月31日に出版された米国出願第033,047号及び1987年6月25日に出版された出願第067,103号の部分継続出願である。

(技術分野)

本発明は、ヒトの組織因子重鎖タンパク質(huTFh)をコードする構造遺伝子を有する組織因子DNA分子(rDNA)に関し、より詳細には、本発明は、宿主細胞中に含まれる、huTFhを発現しうる発現ベクターに関するものである。また、本発明はhuTFhの合成ポリペプチド類似物及びhuTFh及び該ポリペプチド類似物と結合するモノクローナル抗体に関する。

(発明の背景)

凝血は、一群の凝固因子として知られる細胞性及び血漿性タンパク質によって仲介される。一連の、酵素、共因子、タンパク質分解及びゲル化反応のカスケードによって起こる。このカスケードの開始は、組織因子(TF)として知られる細胞性レセプターが、凝固因子Ⅲ又はその無活性体、因子Ⅲ_aと結合し、触媒的に活性のある複合体を形成したときに起こる。TFの非存在下、及び複合体への連続する結合がない場合には、Ⅲ/Ⅲ_aは凝集を開始しない。従って、TFの化学的かつ生化学的特性が、凝集のメカニズムを理解する上で重要なことは明白である。

組織因子は、通常循環器中で可溶化しておらず、また、因子Ⅲ/Ⅲ_a及び他の凝固因子を含む血漿タンパク質と接触できないことが分っている。膜に結合した糖タンパク質である。組織因子は

混合物の界面活性剤及びイオン組成に影響されると報告されている。ネマーソン(Nemerson)、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 47~72頁(1968); ネマーソン(Nemerson)、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 48~52頁(1969年); 及びカーソン(Carson)等、サイエンス(Science)、208巻、307頁(1980年)参照。

単離した、もしくは、再結晶化したTF含有タンパク質調製物は、数々の種の組織から抽出物によって調製した。組織因子は、天然の組織中に非常に少量しか存在しないので、歴史的に使用されてきた方法は、困難で、時間もかかり、かつ低収率であった。古典的方法のレビューとしては、ネマーソン(Nemerson)等の報告(Progress in Hemostasis and Thrombosis (Prog. Hem. Thromb.) 6巻、237~261頁(1982年)を参照せよ。

最近、ブローズ(Broze)等(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.) 260巻、10917~20(1985年))ボム(Bom)等(Thromb. Res.) 42巻、635~643頁(1986年)及びグハ(Guba)等(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 83巻、299~302頁(1986年))は、脱脂質化組織因子タンパク質を、非イオン性界面活性剤及びCaCl₂を含む水溶性溶液に溶かした時、該タンパク質が因子Ⅲ/Ⅲ_aと結合するという発見に基づいた方法を用いて、ヒトの組織因子(huTF)タンパク質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質を単離する手段として、因子Ⅲ/Ⅲ_a製剤と性吸着体を用いる。これ

通常、血管を形成している細胞の表面上には発現されていないが、血管中の単球によるその発現は、バクテリアのリポ多糖のような感染性抗原成分、ある抗原により刺激されたTヘルパー細胞から誘導され、直接的にはある刺激されたTヘルパー細胞由来のリンネカイン及び免疫複合体によって誘導することができる。例えばバクテリアのリポ多糖同様、インターロイキン1及び腫瘍壊死因子アルファのような単細胞/マクロファージのある炎症性細胞は血球の体液側表面にTFを発現する内皮細胞を刺激することができる。典型的に、血管要素におけるTFの発現は、拡大する血管内凝血又は、局所的な凝血の開始、すなわち血栓形成を起こす。

組織因子は、試験管内の繊維芽細胞を含む培養物中のある血管外細胞、未同定型の細胞及び基底膜バリアーにより、循環する血漿タンパク質から分離されている上皮細胞の表面上に構成的に発現される。これら細胞上のTFの存在は、組織損傷の結果としての血液との接触でクロットを形成する。従って、TFは、凝血システムを開始する基盤である。

ハウエル(Howell)(アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー(Am. J. Physiol.)) 31巻1頁(1912年)の報告は、TFを含む単離した組織タンパク質調製物は、リン脂質-タンパク質(リポタンパク質)複合体として存在するときのみ凝集を促進することができることを示す最初の報告である。典型的に、TF含有組織タンパク質の単離が、通常TFタンパク質と含有しているリン脂質を除去してしまうので、単離したタンパク質を再結晶化することによるTFの機能的プロコアグラント活性の再構成が必要であることから、これら再構成の研究が多くの研究者によって行われてきている。例えば、凝集活性の回復は、リン脂質のタイプ、タンパク質に対するリン脂質の比、及び再構成

ら方法の使用は、有意量の単離Ⅲ/Ⅲ_aを入手することの困難性のみならず、因子Ⅲ/Ⅲ_aの不安定性によっても制限される。

ブローズ等(上記)は、huTFに特異的なモノクローナル抗体の開発及び免疫親和性吸着体としてのそれらの使用は、因子Ⅲ/Ⅲ_a使用の問題によって起こる問題を回避できることを指し示している。しかし、抗-huTFモノクローナル抗体は、該文献中には報告されていない。さらに、子牛のTFによって生じる2つのモノクローナル抗体(カーソン(Carson)等、ブラッド(Blood), 662巻156頁(1985年))は、huTFとは免疫反応を起こさない(グハ(Guba)等、上記)。

(本発明の概要)

1つの態様において、本発明は、ヒトの組織因子重鎖(huTFh)タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わずかに約12,000塩基対を含むDNA断片を考案している。該構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番で示されているアミノ酸残基を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、該構造遺伝子は、第2図の約130番から、約918番で示されるスクレオチド塩基配列を有することが好ましい。

望ましい態様においては、そのDNA断片は、第1の配列の5'末端と連続し、かつ、huTFhタンパク質のアミノ末端に結合したアミノ酸残基リーダー配列をコードする第2の配列を含む。その第1及び第2のDNA配列は一緒になって、ヒトの組織因子重鎖前駆体(プレhuTFh)タンパク質をコードする混成構造遺伝子を定義している。該混成構造遺伝子は第1図の約32番から約263番で示されるアミノ酸残基を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さらに、該混成構造遺伝子は、第2図の約34番から約918番のスクレオチド塩基配列を

有することが望ましい。

別の態様において、本発明は、ヒトの組織因子重複タンパク質をコードする1つの構造遺伝子を定義する第1のDNA断片と機能的に結合したベクターを含む組換えDNA分子を考案している。さらに該組換えDNA分子は、第1の断片の5'末端に連続し、上記タンパク質に結合するアミノ酸残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片を含むことが好ましい。すなわち、上記の第1及び第2のDNA断片は一緒になって、上記タンパク質の前駆体をコードする遺伝子構成遺伝子を定義している。

別の態様において、本発明は、わずかに50アミノ酸残基を含み、かつ式



で表わされる配列に相当するアミノ酸残基配列を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考案している。

さらに好ましくは、本発明はわずかに50アミノ酸残基を含み、かつ、



からなる群から選択される式で表わされる配列に相当するアミノ酸残基を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考案している。

さらに本発明の態様には、

- a) ヒトの組織因子重複タンパク質と免疫反応する、
- b)

また、本発明は、

- a) 生理学的に許容される希釈剤及び効果的な生体内指示手段と結合させたハイブリドーマTF9-10H10によって作られたある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者に静脈注射により投与し、血柱中に存在するヒトの組織因子と免疫反応させる、
 - b) 該抗体分子が、血柱の一部として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、かつ、免疫反応物質を形成するのに十分な時間、その投与を受けた被検者を維持する、
 - c) ステップb)で生成した免疫反応生成物の存在を決定する、
- 以上a)~c)のステップを含む、生体内で血柱を検出する方法も考案した。

さらに、本発明は、TF8-5G9及びTF9-6B4からなる群から選択されるハイブリドーマにより生産され、存在するヒトの組織因子と効率よく結合する、ある量の抗体分子を含む生理学的に許容される希釈剤を含有するモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈注射によって投与することを含む、生体内で、組織因子Ⅷ/Ⅷaと結合するヒトの組織因子の能力を中和する方法も考案している。

また、本発明は、因子Ⅷ/Ⅷaと反応するのに有効な量の、

からなる群から選ばれるポリペプチドを含む生理学的に許容され

からなる群から選択される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する、

- c) 実質的に第1図の部位204から部位226で示される式で表わされるポリペプチドとは免疫反応しない、抗体分子を含む抗体組成物である。

また、本発明は、ハイブリドーマTF8-5G9、TF9-10H10、TF9-5B7及びTF9-6B4と、それらハイブリドーマによって生成される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を考案している。

本発明は、

- a) 身体試料を、ヒトの組織因子重複タンパク質と混合し、免疫反応混合物を作る、
 - b) その混合物を、抗体が、その試料中に存在するヒトの組織因子と免疫反応し、免疫反応産物を作るのに十分な時間維持する、そして、
 - c) ステップb)で生じた免疫反応産物の存在を検出する、
- 以上のステップを含む身体試料中のヒトの組織因子重複タンパク質の存在を決定する方法も考案している。

希釈剤を含有するポリペプチド組成物を、静脈注射で被検者に投与することを含む、生体内で、ヒトの組織因子が、組織因子Ⅷ/Ⅷaに結合することを阻害する方法を考案している。

別の態様において、本発明は、本発明の抗体組成物を含有するパッケージを含む、試料中のヒトの組織因子重複タンパク質の存在を決定する、キットの形をとった診断システムを考案している。

その抗体組成物は、

- a) TF8-5G9、
- b) TF9-6B4、
- c) TF9-10H10、
- d) TF9-5B7、

からなるハイブリドーマの群から選ばれたハイブリドーマにより生産されるモノクローナル抗体を含むことが望ましい。

また、試料から血液凝固因子Ⅷ/Ⅷaを単離する方法も考案された。

この方法は、

- a) 固体マトリックスに固定した、請求項15記載のポリペプチドを含む固体サポートと試料を混合することにより結合反応混合物を作る、
 - b) 上記結合反応混合物を、上記凝固因子が上記ポリペプチドと結合し、固体複合体及び上清を作るのに十分な時間、維持する、
 - c) 上記複合体から、上記上清を分離する、そして
 - d) ステップc)の分離した複合体から、上記凝固因子を回収する、
- 以上、a)~d)のステップを含む。

さらに、実質的に、ヒトの組織因子重複タンパク質を含まない、生物学的に活性のあるヒトの組織因子重複タンパク質の水溶液を含む組成物を考案した。この生物学的に活性のあるヒトの組織因

子重鎖タンパク質は、リン脂質又は、非イオン性界面活性剤中に分散されていることが望ましい。

血管系細胞試料中の凝集能力を決定するための、ネットの形をとった診断システムも考案された。それは、実質的にヒトの組織因子軽鎖タンパク質を含まない、少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、生物学的に活性のある、ヒトの組織因子重鎖タンパク質の水溶液組成物を含有するパッケージを含む。その重鎖タンパク質は、リン脂質中に分散されていることが望ましい。

別の態様において、成熟したヒトの組織因子重鎖タンパク質の調製法及びその方法によるタンパク質発現産物も考案されている。この方法は、

- 栄養培地中、ヒトの組織因子重鎖タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第1のDNA断片及びその第1の断片に連続し、かつ、上記タンパク質に付随するアミノ酸残基リーダ配列をコードする第2のDNA断片と機能的に結合し、宿主ホ乳細胞と適合する発現ベクターで、上記第1及び第2のDNA断片が上記タンパク質の前駆体型をコードする遺伝子構造遺伝子を定義するものであるようなベクターを含む組換えDNA分子でトランスフォームした宿主ホ乳細胞の培養を開始する、
 - その培養物を、上記細胞が、上記組換えDNA分子からタンパク質を発現し、かつ、上記成熟型のタンパク質を形成するのに十分な時間維持する、そして、
 - 上記培養物から、上記成熟型のタンパク質を回収する、
- 以上a)～c)のステップを含む。

図式の簡単な説明

図式は本公開の一部を形成している。

第1図は、1文字アミノ酸残基コードを用い、左から右に、ア

ミノ末端からカルホキシ末端の方向で、ヒトの組織因子重鎖タンパク質の成熟型及び前駆体(各々、hуTFh及びpreуTFh)の完全なアミノ酸残基配列を示している。主な天然の成熟型タンパク質のアミノ酸残基配列は、1番から263番に対応する。マインナーな成熟型タンパク質の配列は、3番のアミノ酸残基から始まり、263番の残基で終わる。成熟プロセスで除去されるリーダ配列(前駆体領域)に相当するアミノ酸残基配列は、マインナー番号で示した。細胞外ドメイン及びトランスメンブレン・アンカー領域は各々、部位1～219及び220～242に対応する。

第2図は、1文字ヌクレオチド塩基コードを用い、左から右に5'末端から3'末端の方向で、preуTFh及びhуTFhタンパク質をコードする、cDNAのヌクレオチド配列を示している。hуTFhの構造遺伝子は塩基130から始まり、塩基918で終わる。

その読み方は、各アミノ酸を示す1文字を、対応するコドンの中央の塩基上に置くやり方で、ヌクレオチド配列の上に推察されるアミノ酸残基を付置することにより示した。

第3図は、例2で説明されている、hуTFの凝集活性を測定するのに用いる、凝集検定を示す図である。両対数プロットは、秒とミリリットル当りのビコグラムで表わしたヒトの組織因子(hуTF)濃度で示される、ヒトのクエン酸化血漿凝集(凝血)時間を示したものである。

第4図は、10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子Ⅴ/Ⅴaの親和性で単離したhуTFhのオートフルオログラムを示している。レーンAは、例4で説明されているように、単離され、電気泳動前に、ジチオスレイトール(DTT)で還元した¹²⁵Iラベル化hуTFを示している。レーンBは、キログル

トン(k)で示した見かけの分子量をもつ分子量標準物質を示している。

第5図は、15%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子Ⅴ/Ⅴaの親和性で単離したhуTFのオートフルオログラムを示している。hуTFの単離、¹²⁵Iによるラベル化及び電気泳動は、例4と同様に行った。レーンAは、DTTによる還元後の単離したhуTFを示している。レーンBは、DTT還元なしで、電気泳動した同サンプルを示している。上のバンド及び下のバンド(U及びLと表示した)は、各々、約58及び47kの大きさのhуTFに対応している。オートフルオグラフィ後、上のバンド及び下のバンドを切り出し、DTTを含むSDSサンプルバッファ中で再水和し、第2の15%アクリルアミドゲルのサンプルウェルに入れ、電気泳動した。レーンCは、レーンBから得られた、下のバンドの再電気泳動の結果を示している。レーンDは、レーンBから得られた上のバンドの再電気泳動の結果を示している。12.5及び47キログルトン(k)の見かけ上の分子量をもつタンパク質が矢印で示されている。

第6図は、例4で説明されているように、25hуTF特異的モノクローナル抗体で免疫沈殿化し、ついで8～17%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子Ⅴ/Ⅴaの親和性で単離したhуTFのオートフルオログラムを示している。レーンAは、DTTによる還元を伴う、電気泳動した¹²⁵Iラベル化hуTFを示している。レーンBは、還元なしで電気泳動した同サンプルを示している。

第7図は、15%アクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子Ⅴ/Ⅴaの親和性で単離したhуTFのオートフルオログラムを示している。単離、¹²⁵Iによるラベル化、還元及び脱グリコシ

ル化は、例4で説明されているように行った。レーン1は、キログルトンで表わされた見かけ上の分子量をもつ標準物質として電気泳動したタンパク質標準物質：リゾチーム、14.3；カルボニック・アンヒドラーゼ、30.0；オвалブミン、45.0；ウシ血清アルブミン、69.0；ホスホリラーゼb、92.5；ミオシン、200.0(すべて1L州、アーリントンハイウ・アマーシャム社より入手)を示している。¹²⁵I-hуTFを含むサンプルをDTT存在下(レーン2及び3)又は非存在下(レーン4及び5)で電気泳動した。これら¹²⁵I-hуTF含有サンプルのいくつかは電気泳動前に脱グリコシル化し(レーン3及び5)、他のものは脱グリコシル化しなかった(レーン2及び4)。

レーン3及び5に泳した¹²⁵I-hуTF含有サンプルは、電気泳動前に脱グリコシル化され、レーン2及び4のものは脱グリコシル化しなかった。

第8図は、例9で説明されているように、10%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、免疫親和性で単離されたhуTFのオートフルオログラムを示している。レーン1は、キログルトンで表わされる見かけの分子量をもつ、マーカーとして電気泳動した標準タンパク質：チトクロムC、12.4；ラクトグロブリン、18.4；カルボニック・アンヒドラーゼ、29.0；ラクトート・デヒドロゲナーゼ、35.0；オвалブミン、43.0；グルタマート・デヒドロゲナーゼ、55.0；及びホスホリラーゼb、95.5(全て、MA州ニュートンセンターのダイバーシファイド・バイオテック(Diversified Biotech.)から入手した)を含んでいる。

レーン2は、スミス(Smith)等のBCAタンパク質検定法(アナリティカル・バイオケミストリー(Aнал. biochem.)150巻、76～85頁(1985年))を用いて測定し、かつDTT

を用いて還元した約20 μ gのタンパク質を含んでいる。h u T F 重鎖 (h u T F h) は、明らかに、およそ47Mrの位置に確認され、h u T F 軽鎖は、およそ12.5Mrの位置にわずかに確認された。タンパク質は、レムリ (Lammli) (ネイチャー (Nature), 227巻、680~685頁 (1970)) の報告に従がい、コマーシブル染色により可視化した。

第9図は、h u T F h の非リン脂質化 (非脂質化) ポリペプチド類似物による、h u T F 由来の凝集開始阻害の投与-応答曲線を示すグラフである。種々の濃度の非脂質化ポリペプチドによる凝集阻害率は、例12に説明されているように測定した。テストしたポリペプチドは、p26-49 (Δ T F 26.49)、p121-155 (○、T F 121、155)、p145-167 (●、T F 145、167) 及び p204-226 (■、T F 204、226) である。

第10図は、h u T F h のリン脂質化した (脂質化した) ポリペプチド類似物による、h u T F 由来の凝集開始阻害に関する投与-応答曲線を示すグラフである。その阻害率は例9で説明されているように、両方法により、同類似物に対して測定した。

第11図は、組換えDNAプラスミド p C T F 64、p C T F 314 及び p C T F 403 内の Eco R I 断片挿入物の制限地図を示したものである。その挿入物 (—) は、プレ h u T F h 遺伝子の完全なヌクレオチド配列に対応する重複するヌクレオチド配列領域を示している。別に、その挿入物は、第2図で示されている、残基1~486 (p C T F 64に含まれている)、残基135~775 (p C T F 314に含まれている)、及び残基776~1125 (p C T F 403に含まれている) 由来のヌクレオチドに対応するヌクレオチド配列を、左から右に5'から

3'の方角で含んでいる。また、例15で述べられている種々の組換えDNA分子を構築するのに用いられた挿入物内の制限酵素切断部位のおよその位置も示されている。さらに、完全な形で示されるリーダーペプチド ([55]) 及びトランスメンブレン・アンカードメイン ([56]) をもつプレ h u T F h タンパク質のおよその位置も示してある。

第12図は、h u T F h の非リン脂質化 (非脂質化) ポリペプチド類似物による、h u T F 由来の凝集開始の阻害を示す、投与-応答曲線のグラフである。モル濃度で表わした種々の濃度の非脂質化ポリペプチドによる凝集の阻害率 (%) は、例12に述べられているように測定した。試験したポリペプチドは、p24-35 (Δ)、p26-49 (○)、p152-169 (□) 及びペプチド p40~71、p72~104、p94~123及び p161189 であるがこれらは全て、実質的な阻害を示さず、無効的に黒丸 (●) で示した。

第13図は、T F 8-5 G 9 抗体組成物による凝集阻害の速度曲線を示すグラフである。凝集の阻害率 (%) は、例18で述べられているように測定された種々の抗体免疫反応時間にわたってプロットしてある。

第14図は、h u T F 由来の凝集の抗 h u T F 抗体による阻害の投与-応答を示すグラフである。種々の濃度の抗 h u T F モノクローナル抗体 T F 8-5 G 9 による凝集の阻害率 (%) は例19に述べられているように測定した。

第15図は、h u T F 源がヒトの線維芽細胞系 GM 1381 の細胞破産物である、h u T F 由来の凝集の、抗 h u T F 抗体による阻害の投与-応答のグラフである。種々の濃度の抗 h u T F モノクローナル抗体 T F 8-5 G 9 による凝集の阻害率 (%) は、

例19に述べられているように測定した。白丸 (○) は T F 8-5 G 9 抗体を示し、黒丸 (●) は無関係の抗体を示している。

第16図は、抗 T F モノクローナル抗体 T F 8-5 G 9 による精製したヒトの脳 T F の凝集活性の阻害を示している。リン脂質ベシクル中に再構成された、精製したヒトの脳 T F の凝集活性は、種々の濃度の精製 IgG と、37℃30分間、前処理した後測定した。丸は、抗 T F 抗体 T F 8-5 G 9 に対するもので、三角は、無関係なコントロール抗体 P A b 100 に対するものである。データは、抗体を加えない場合の活性に対する阻害率として表わされている。

第17図は、精製した抗 T F モノクローナル抗体で処理した、培養された J 82 膀胱がん細胞に対する阻害因子の結合及び、その細胞による因子 X の形成を示している。因子 X の形成率の阻害の値は、三角で表わされ、因子 Y の結合阻害の値は、丸で表わされている。データは、抗体を加えないでインキュベートした細胞を用いて得られる値に対する阻害率で表現されている。パネル A は抗体 T F 9-2 C 4 の効果、パネル B は、抗体 T F 9-5 B 7 の効果を示している。

第18図は、例25で述べられているような、免疫親和性で単離した h u T F のウェスタンブロット分析を示している。15% ポリアクリルアミドゲルに次に示すものがかけられた。レーン1は、キログルトン (k) でパネル A の左に示された見かけの分子量をもつ分子量標準が含まれる。レーン2は、電気泳動前に還元された、精製ヒトヘモグロビン1 μ gを含んでいる。レーン3は、単離した h u T F を電気泳動前に還元したもの0.5 μ gを含んでいる。レーン4は、非還元、単離された h u T F 0.5 μ gを含んでいる。SDS-PAGE後、生じたタンパク質バンドを電気

泳動的にニトロセルロースに移した。このようにして作ったウエスタン・ブロットを0.2 μ g/mLの親和性精製したウサギ抗 h u T F IgG (パネルA)、1 μ g/mLのウサギ抗ヘモグロビンIgG (パネルB)又は、1 μ g/mLの非免疫ウサギIgG (パネルC)と免疫反応させた。免疫染色したバンドの見かけの分子量を右にkDaで示した。

発明の詳細な説明

A. 定義

アミノ酸：ここで固定される全てのアミノ酸は、天然のL-型のものである。標準的ポリペプチド命名法に従い (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 243巻、3557~59頁 (1969))、アミノ酸残基の略号は、次の照会表に示されているとおりである。

対 照 表

| 記 号 | アミノ酸 | |
|-------------|-------------|----------|
| <u>1 文字</u> | <u>2 文字</u> | |
| Y | Tyr | チロシン |
| G | Gly | グリシン |
| F | Phe | フェニルアラニン |
| M | Met | メチオニン |
| A | Ala | アラニン |
| S | Ser | セリン |
| L | Ile | イソロイシン |
| L | Leu | ロイシン |
| T | Thr | スレオニン |
| V | Val | バリン |
| P | Pro | プロリン |

特表平1-503438 (8)

| | | |
|---|-----|---------|
| K | Lys | リジン |
| H | His | グルタミン |
| Q | Gln | グルタミン |
| E | Glu | グルタミン酸 |
| W | Trp | トリプトファン |
| R | Arg | アルギニン |
| D | Asp | アスパラギン酸 |
| N | Asn | アスパラギン |
| C | Cys | シスチン |

ここでは、全てのアミノ酸配列は、従来どおり左から右に、アミノ酸末端からカルボキシ末端への方で示されていることに注意を要する。さらに、アミノ酸残基配列の始め又は終りのダッシュは、各々、アミノ及びカルボキシ末端のH及びOH（水素及び水酸基）のようなラジカルへの結合、もしくは、ポリペプチド鎖における1から約15残基の1つ以上のアミノ酸残基配列を示している。

ポリペプチド及びペプチド：ポリペプチド及びペプチドはここでは、炭水化物のアルファアミノ基とカルボキシル基の間のペプチド結合により互いに直線的に結合した、わずかに50アミノ酸残基を意味するものとして互換的に用いられている。

タンパク質：タンパク質は、ポリペプチドのように互いに直線的に結合した50以上のアミノ酸残基を意味して用いられている。

ヌクレオチド：糖部分（ペントース）、リン酸及び窒素ヘテロ環塩基からなるDNA又はRNAの単量体ユニット。この塩基はグリコシド炭素（ペントースの1'炭素）を介して糖部分と結合しており、塩基と糖の組合せはヌクレオチドと呼ばれる。ヌクレオチドがペントースの3'又は5'部位に結合するリン酸基を含む

タンパク質をコードする構造遺伝子を形成するDNA配列がDNA断片中に含まれることが望ましい。その遺伝子はh u T F h又はプレh u T F hタンパク質中にあるアミノ酸残基をコードする各コドンが中断することなく連続して存在する、すなわち、イントロンを含まない遺伝子であることが好ましい。

従って、第2図に示される、5'末端の約130番から、3'末端の約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、h u T F hを発現することができるDNA断片が本発明の1断片を構成している。第2図に示される、約34番から約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、プレh u T F hを発現できるDNA断片が、本発明のもう1つの断片を構成している。

好ましい、可溶性のh u T F h分子は、h u T F hをコードするDNAの5'末端の約150塩基によってコードされるアミノ酸残基を欠いている。従って、第2図に示される、5'末端の約130番から約756番を経由して、3'末端の約801番の部位までの配列を基本的に含み、かつ、可溶性のh u T F hを発現できるDNA断片は、本発明のさらに好ましい断片を構成する。可溶性のh u T F h構造遺伝子を形成する、典型的な好ましいDNA断片は、第2図に示されている、約130番から約756番、約130番から約771番、約130番から約786番、及び約130番から約801番で表わされるヌクレオチド配列を有するものである。

可溶性プレh u T F hをコードする、好ましいDNA断片は、それらが、第1図に示されるように、-32番から0番までのアミノ酸残基で示されるような、アミノ末端リーダー配列を含むタンパク質をコードしていること以外は、可溶性h u T F hをコードしているものと同じである。従って、可溶性プレh u T F h

むとき、それをヌクレオチドと呼ぶ。

塩基対 (bp)：二本鎖DNA分子内でのアデニン (A) とチミン (T) 又はシトシン (C) とグアニン (G) の組合せ。

B. DNA断片

生物において、タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列は遺伝子コードを介して、そのタンパク質をコードする構造遺伝子のデオキシリボ核酸 (DNA) 配列に直接関係づけられる。従って、構造遺伝子は、それがコードするタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸残基配列で定義することも可能である。

重要でかつよく知られた遺伝子コードの性質にリダグンシーがある。すなわち、タンパク質を作るのに用いられるほとんどのアミノ酸に対し、1つ以上のコードするヌクレオチド・トリプレット (コドン) が、1つのアミノ酸残基をコード又は指定している。それ故、1つのアミノ酸残基配列をコードするのに多くの異なるヌクレオチド配列が存在することになる。そのようなヌクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ酸残基配列を生産することが可能なので、機能的には等価であると考えられている。場合によっては、プリン又はピリミジンのメチル化物がヌクレオチド配列の中に組み込まれている事もある。しかし、そのようなメチル化は、コード関係にはなんら影響しない。

本発明のDNA断片は、ヒトの組織因子重鎖タンパク質 (h u T F h) をコードするDNA配列を含むという特徴をもつ。好ましい断片において、このDNA断片は、ヒトの組織因子重鎖単量体タンパク質 (プレh u T F h) をコードするDNA配列を含んでいる。すなわち、本発明のDNA断片は、h u T F h、また、より好ましくは、プレh u T F hの構造遺伝子の存在で特徴づけられる。さらに、可溶性のh u T F h又は可溶性のプレh u T F hタン

をコードする構造遺伝子を形成している、好ましいDNA断片は、基本的に、第2図に示されている5'末端の約34番から756番を経由して、3'末端の約801番で示される配列を含んでいる。典型的な好ましい可溶性のプレh u T F hコードのDNA断片とは、第2図に示されているところの、約34番から約756番、約34番から約771番、約34番から約786番及び約34番から約801番のヌクレオチド塩基配列を有するものである。

可溶性も含めて、上記h u T F h及びプレh u T F hタンパク質をコードする相同的DNA及びRNAも先に開示したように考案された。

h u T F h及びプレh u T F hをコードするDNA断片は化学的技術、例えばマテウシ (Matteucci) 等のホスホトリエステル法 (ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサィエティー (J. Am. Chem. Soc.) 103巻3185頁 (1981年)) により容易に合成できる。(ここで引用されている技術の公開は参考として送達されている。) もちろん、コード配列を化学的に合成することにより本来のアミノ酸残基配列をコードする代りに適当な塩基を用いることにより、いかなる修正も望みどおりにすることができる。しかし第2図に示されているものと全く相同的な配列を含むDNA分子の方が望ましい。

さらに、基本的にh u T F h及びプレh u T F hタンパク質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片は、これらの遺伝子を含む組換えDNA分子から得ることができる。例えば、プラスミドタイプの組換えDNA分子p C T F 64、p C T F 314及びp C T F 403はいずれもh u T F h及びプレh u T F hタンパク質の異なる領域をコードするDNA配列を含んでおり、また、これらを

合せると、各タンパク質を発現するのに必要な全てのDNA配列を有することになる。各々、pCTF64、pCTF314又はpCTF403でトランスフォームした大腸菌の培養物は、1987年3月27日、ブダペスト協定に基づき、MD州、ロックビル、パークローン、ドライブ12301番、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に保管され、各々、受理番号67370、67368及び67369が割当てられた。

hUTFh又はプレhUTFhをコードするDNA配列を含むDNA断片は、よく知られている方法を用い、先に述べた各プラスミドからの適当な制限断片を随機的に結合することにより作ることができる。典型的に、本方法で作られた本発明のDNA分子は、粘着末端、すなわちこの分子の二本鎖領域を越えて伸びた“突き出した”一本鎖領域をもっている。本発明のDNA分子上に粘着末端があることは望ましいことである。

本発明は、上述のDNA断片と等価なりボ核酸(RNA)も考慮している。

C. 組換えDNA分子

本発明の組換えDNA分子は、本発明のDNA断片をベクターに随機的に結合することにより作ることができる。

ここで用いられているように、“ベクター”という言葉は、細胞中で自己複製できるDNA分子で、別のDNA断片を随機的に結合することができ、その結合した断片の複製をもたらすものを意味する。hUTFh及びプレhUTFh遺伝子の発現を司ることができるベクターは、ここでは“発現ベクター”と呼ばれる。従って、組換えDNA分子(rDNA)とは、天然においては通常一連に存在することはない少なくとも2つのスクレオナド配列を含むハイブリッドDNA分子のことである。

バイオラド・ラボラトリーズ社)及びpPL、pKK223(WJ州、ピスカタウェイ、ファルマシア社)がある。

真核細胞、好ましくは脊椎動物細胞と適合する発現ベクターも、本発明の組換えDNA分子を作るのに用いられる。真核細胞発現ベクターもこの分野でよく知られており、数社から市販されている。典型的にはこれらのベクターは、目的とするDNA断片の挿入に便利な制限部位を含んでいる。これらのベクターの典型的なものには、pSUL及びpKSV-10(ファルマシア社)、pBPV-1/pML2d(インターナショナルバイオテクノロジー社)及びpTDT1(ATCC、#31255)がある。

好ましい態様において、本発明の組換えDNA分子を構築するのに用いられる真核細胞発現ベクターは、真核細胞中で効果的な選択マーカー、好ましくは、薬剤耐性選択マーカーを含んでいる。好ましい薬剤耐性マーカーとは発現によりネオマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子である。サウザン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. Mol. Appl. Genet.)1巻、327~341頁(1982年)。

本発明のrDNAを作るための、レトロウイルス発現ベクターの使用も考慮されている。ここで用いられているように、“レトロウイルス発現ベクター”とは、レトロウイルスゲノムのロングターミナル・リピート(LTR)領域由来のプロモーター配列を含むDNA分子を意味する。

好ましい態様において、典型的な発現ベクターは、真核細胞中では複製不能なレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルスの構築と使用法は、ソージ(Sorja)等により報告されてい

本発明のDNA断片を随機的に結合させるベクターの選択は、この分野ではよく知られているように、例えば、タンパク質の発現などの機能性性質及びトランスフォームされる宿主細胞などが組換えDNA分子の構築技術の上で本質的な制限となることから、これらに直接依存する。しかし、本発明によって考案されたベクターは、これに随機的に結合しているDNA断片中に含まれるhUTFh又はプレhUTFh遺伝子の、少なくとも複製を、好ましくは発現をも可能にする。

好ましい態様において、本発明により考案されたベクターは、原核性のレプリコン、すなわち、バクテリア宿主細胞のような原核細胞中の、これをトランスフォームした染色体外組換えDNA分子の自己複製及び維持を可能とするDNA配列を含んでいる。このようなレプリコンは、この分野ではよく知られている。さらに、原核性レプリコンを含むこれらの態様は、これをトランスフォームしたバクテリア宿主に薬剤耐性を与える遺伝子も含んでいる。典型的なバクテリアの薬剤耐性遺伝子は、アンピシリン又はテトラサイクリンに対する耐性を与えるものである。

原核性レプリコンを含む、これらのベクターは、これをトランスフォームした大腸菌のようなバクテリア宿主細胞中で、hUTFh又はプレhUTFh遺伝子が発現(転写及び翻訳)させることができる原核性プロモーターも含んでいる。プロモーターとは、RNAポリメラーゼの結合を許し、転写を開始させる、DNA配列で成る発現コントロール要素である。バクテリア宿主と適合するプロモーター配列の典型的なものは、本発明のDNA断片の挿入に便利な制限部位を含むプラスミドベクター中に存在する。このようなベクター・プラスミドの典型的なものには、pUC8、pUC9、pBR322、pBR329(CA州、リッチモンド、

モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.)4巻、1730~1737頁(1984年)。

相補的なホモポリマー末端を介して、DNAをベクターに随機的に結合する多くの方法が開発されてきている。例えば、相補的なホモポリマーを、挿入するDNA断片及びベクターDNAに付加することができる。それから、このベクターとDNA断片を相補的なホモポリマー末端間の水素結合で結合し、組換えDNA分子を作る。

1つ以上の制限部位を含む合成リンカーは、DNA断片をベクターに結合するもう1つの方法を提供する。先に報告されているように、エンドスクレアーゼで制限消化することによって生成したDNA断片を、3'-5'エンドスクレアーゼ活性で突出する3'、一本鎖末端を除き、また重合活性で、くばんだ3'末端を充填する酵素、バクテリオファージT4DNAポリメラーゼ又は、大腸菌DNAポリメラーゼIで処理する。従って、これらの活性の組合せで、平滑末端DNA断片が生ずる。それから、この平滑末端断片を、バクテリオファージT4DNAリガーゼのような、平滑末端DNA分子のライゲーションを触媒することが出来る酵素の存在下、大過剰のリンカー分子とインキュベーションする。このような反応でその末端にポリリンカーをもつDNA断片ができる。さらにこのDNA断片を適当な制限酵素で切断し、このDNA断片と適合する末端を作る酵素で切断した発現ベクターとライゲーションする。

多量の制限エンドスクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、CN州ニューヘブーン、インターナショナルバイオテクノロジー社を含む多くの会社から市販されている。

本発明は、上述の組換えDNA分子と等価なRNAも考慮して

いる。

D. トランスホームした細胞と培養

本発明は、本発明の組換えDNA分子、好ましくは可溶性のhUTFh又はプレhUTFhを発現できるrDNAでトランスホームした宿主細胞にも関連している。この宿主細胞は、原核性でも真核性でもよい。バクテリア細胞は、原核宿主細胞であることが好ましく、また典型的には、ND州ベセスダ、ベセスダ・リサーチラボラトリー社から入手できる大腸菌DH5株のような、大腸菌の株である。好ましい真核性宿主細胞には、イースト及び哺乳類細胞、好ましくはマウス、ラット、サル又はヒトの繊維芽細胞系列のような脊椎動物細胞が含まれる。好ましい真核性宿主細胞には、CCL61としてATCCから入手できるチャイニーズ・ハムスターの卵巣(CHO)細胞及びCRL1658としてATCCから入手できるNIHスイスマウス胚細胞がある。

本発明の組換えDNAによる適当な細胞宿主のトランスホーム・メーションは、典型的には用いるベクターのタイプに応じて、よく知られている方法により行なわれる。例えば、原核性宿主細胞のトランスホーム・メーションに関しては、コーエン(Cohen)等のプロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、69巻、2110頁(1972年)；及びマニアス(Maniatis)等のNY州コールド・スプリング・ハーバー・コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、ラボラトリー・マニュアル、モレキュラー・クロニングを参照せよ。脊椎動物細胞のrDNAを含むレトロウイルス・ベクターによるトランスホーム・メーションに関しては、例えば、ソージ(Sorge)等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 4巻、1730~1737頁(1984

年)、グラハム(Graham)等、ウィロロジー(Virol.)、52巻、456頁(1973年)；及びウィグラー(Wigler)等、プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、76巻、1373~1376頁(1979年)を参照せよ。

うまくトランスホームされた細胞、すなわち、本発明の組換えDNA分子を含む細胞は、従来の方法によって同定することができる。例えば、本発明のrDNAの導入から生じた細胞をクローン化し、モノクローナルコロニーを作る。これらのコロニーから細胞を収穫し、溶解し、そのDNA内容物について、サウザン(Southern)(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.) 98巻、503頁(1975年)又は、ベレント(Berent)等(バイオテクノロジー(Biotech.) 3巻、208頁(1985年)によって報告されている方法を用いて、そのrDNAの存在を調べた。

rDNA存在の直接的検定に加え、成功したトランスホーム・メーションは、そのrDNAがhUTFh又はプレhUTFhを発現することができるときは、従来の免疫学的方法で確かめることができる。例えば、発現ベクターでうまくトランスホーム・メーションできた細胞は、hUTFh又はプレhUTFh抗原性を示すタンパク質を生産する。トランスホームさせた細胞試料を収穫し、本発明のハイブリド・フォーマットによって生産される抗原等に特異的な抗体を用い、hUTFh又はプレhUTFhを検定する。

このように、トランスホームした宿主細胞それ自体に加え、本発明は、培養地中のそれらの細胞の培養物好ましくは、モノクローナル(クローン的に均一な)培養物、又は、モノクローナル培養物由来の培養物も考慮した。この培養物は、hUTFh又は

プレhUTFh抗原性を示すタンパク質、またさらに好ましくは、生物学的に活性なhUTFhを含むことが望ましい。

トランスホームした宿主細胞を培養するのに有用な培養地は、当分野ではよく知られており、また、いくつかの販売会社より市販されている。宿主細胞が哺乳類細胞であるような態様においては、“無血清”培地を使うことが望ましい。

B. hUTFh及びプレhUTFhタンパク質の生産方法

本発明の別の特徴には、hUTFh抗原性を示すタンパク質の生産方法がある。hUTFh抗原性を示すタンパク質は天然の組織因子によって誘導される抗体を免疫反応を起こすタンパク質である。hUTFh抗原性を示すタンパク質は、抗原として有用であり、又、抗体を生じさせるときにも有用で、その各々が本発明の診断システムや診断法で使用することができる。

本方法は、hUTFh又はプレhUTFh、好ましくは可溶性のhUTFh又は可溶性のプレhUTFhを発現することができる。本発明の組換えDNA分子でトランスホームした宿主細胞、好ましくは、ヒトの細胞を含む栄養培地を含む培養の開始する。この培養を、そのトランスホームした細胞がhUTFh又はプレhUTFhタンパク質を発現するのに十分な時間維持する。発現したタンパク質をその培地から回収する。好ましい態様において、本発明の方法によって作られたhUTFhタンパク質はさらにhUTFhの生物学的活性すなわち、因子W/W₀と結合する能力を示す。これらの方法は、宿主細胞においてプレhUTFh遺伝子を発現できる組換えDNA分子でトランスホームした哺乳類宿主細胞の培養を含んでいる。その培養により、プレhUTFhタンパク質が発現し、つづいて、そのプレhUTFhの細胞内での翻訳後の修正が起こり、生物学的に活性のあるhUTFhタン

パク質が生じる。

培養物から、発現したタンパク質を回収する方法は、当分野ではよく知られたことであり、従来の生化学的方法を用い、その培養物のタンパク質含有成分の分析が含まれる。例えば、タンパク質の分析に対して知られているゲル濾過法、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー及びそれに類するものが、培養物中にある発現タンパク質の単離に用いることができる。さらに、免疫親和性、免疫吸着若しくはそれに類するもののような、免疫化学的方法も、従来法を用いて行なわれる。

F. hUTFh及びプレhUTFhタンパク質組成物と発現産物

本発明は、また本発明のrDNAのhUTFh及びプレhUTFhタンパク質発現産物も考慮している。好ましい態様において、hUTFh及びプレhUTFh発現産物は第1図で示されているように、各々残基1から263及び32から263に対応するアミノ酸残基を有している。その発現タンパク質は、第1図で示されるプレhUTFh及びhUTFhのアミノ酸残基配列の長さの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%であることが望ましい。

別の態様において、可溶性のhUTFh及びプレhUTFhと、可溶性hUTFhそして、または可溶性プレhUTFhを含む組成物も考慮されている。ここで用いている“可溶性”という言葉は、本来のhUTFh及びプレhUTFh分子の細胞外ドメイン、すなわち、第1図に示すところのアミノ酸残基220までの、hUTFh及びプレhUTFh分子領域を基本的な220までを特徴とするhUTFh及びプレhUTFh分子を意味する。それゆえ、可溶性hUTFh及び可溶性プレhUTFhは、本来の分子で形成されるトランスメンブレン・アンカー領域の實質的部

分(第1図で示すところの残基220から242)を含まない。ここで用いている“h u T F h”及び“プレh u T F h”という言葉は今後特にことわらないかぎり、そのタンパク質の可溶性を含んでいる。

可溶性のh u T F h及び可溶性プレh u T F hは、疏水的なトランスメンブレン・アンカー領域を含んでいないので、これらは、生理学的に許容される水溶液中で実質的に凝集することはない。それゆえ、可溶性のh u T F h及び可溶性のプレh u T F hは、存在するh u T F h又はプレh u T F hタンパク質の少なくとも約70%、好ましくは約80%、そしてより好ましくは約90% (重量パーセント)が非凝集(単量体)型であり、タンパク質濃度約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の生理学的に許容された希釈剤を用いた水溶液を作りうることを特徴とする。タンパク質溶液中に存在する凝集量の測定法は、当分野ではよく知られているところであり、排除カラムクロマトグラフィーによるサイズ分画を含んでいる。

好ましい可溶性h u T F hタンパク質は第1図で示されているところの、アミノ末端の残基約1番から、209番を経由してカルボキシ末端の残基224番で示されるアミノ酸残基を示している。従って、好ましい可溶性h u T F hタンパク質は第1図で示すところの約1番から約209番、約1番から約219番及び約1番から約224番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するものである。

好ましい可溶性プレh u T F hタンパク質は、第1図で示すところの、アミノ末端の-32番から、209番を経由して、カルボキシ末端の224番の残基で表わされるアミノ酸残基を有している。従って、好ましい可溶性プレh u T F hタンパク質は、第

下、血管系液状サンプルを凝集する能力を意味する。凝集能力を決定するのに十分な、典型的h u T F hタンパク質濃度は、例2におけるサンプル/h u T F h比と同じ比を用いたとき、約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは、約1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、そしてより好ましくは約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約1 ng/ml である。もちろん、凝集能力を決定するときに必要な濃度よりも高い濃度であるが、好ましい濃度に希釈しうるh u T F h溶液も考慮されている。

好ましい態様において、h u T F h含有水溶液は、リン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散されたh u T F hを含んでいる。典型的リン脂質:h u T F hタンパク質重量比は、約5:1から12000:1、好ましくは、約50:1から約5000:1そしてさらに好ましくは、約100:1から2500:1の範囲である。

G. ポリペプチド

本発明の各ポリペプチドは、せいぜい約50個、より通常には約35個以下の、そして好ましくは約25個以下のアミノ酸残基を含んでおり、かつ、少なくとも10個の残基を含んでいる。さらに、本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸残基配列及び新しい機能特性を特徴としている。

従って、本発明のポリペプチドの1つの態様は、血液凝集因子W/Vaへのh u T F hの結合を競合的に阻害する能力をその特徴の1部としている。h u T F h結合部位ポリペプチド類似物である。本発明の結合部位類似物は活性化した複合体を作ることなく、すなわち、凝集を開始することなく因子W/Vaに結合することが望ましい。

ここで用いている“複合体”という言葉は、抗原-抗体又は、

1図で示すところの約-32番から214番、約-32番から219番、及び約-32番から約224番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するものである。

1つの態様において、h u T F h及びプレh u T F h発産物はグリコシル化されていない。すなわち、それらは、本発明のrDNAでトランスホーマした宿主細胞中で生産される。

非グリコシル化型のh u T F h及びプレh u T F hは、本発明の接種物及び診断システムにおける免疫原及び抗原として有用である。

典型的には、真核細胞で生産されたh u T F h及びプレh u T F hはグリコシル化されており、また抗原性及び免疫原性に加えて、生物学的活性を有する。ここで用いられているように、“生物学的活性”という語句は、因子W/Vaの依存の凝集を誘導する能力をもつh u T F h又はプレh u T F hタンパク質又はポリペプチドを指して使われる。

このように、本発明は、実質的にヒトの組織因子経路タンパク質を含まない生物学的に活性なh u T F hを含有する水溶液を含む組成物を考慮している。その組成物も実質的に例えばウリル酸ナトリウム等のイオン性界面活性剤、ポリアクリルアミド及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で測定される約、15000ダルトン以下の見かけの分子量を有する組織由来のタンパク質のような物質を含まないことが望ましい。

水溶性のh u T F h含有溶液は血液又はクエン酸化した血漿のような血液由来の産物のような血管系液状サンプルの凝集能力を決定するのに十分な生物学的に活性のあるh u T F hを含んでいる。“凝集能力”という語句は生物学的に活性なh u T F h存在

レセプター-リガンド反応のような特異的結合反応の産物を意味している。代表的複合体としては、免疫反応産物及びここでIFI W/Vaと示されているところの組織因子-因子W/Va結合反応産物がある。

好ましい態様において、h u T F h結合部位類似物は、少なくとも第1図に示されている30-35番のアミノ酸残基を表わしている次に示すアミノ酸残基配列:

-VNQVYT-

を含んでいる。

さらに好ましくは、h u T F h結合部位類似物は、少なくとも、次のアミノ酸残基配列:

-VNQVYTVQIST-及び

-LYYWKSSSSGKKT-

のうちの1つを含んでいる。

これらの配列は、第1図で示すところの各々、30-40及び155-167番の、h u T F hのアミノ酸残基を示している。

さらに一層好ましい場合は、h u T F h結合部位類似物は第1図で示すところの、各々26-49番及び146-167番で表わされている、次のアミノ酸残基配列:

-EPKPYHQVYTVQISTXSDWXSIC-

-VFGNDLIYLYYWKSSSSGKKT-

からなる群から選ばれたアミノ酸残基配列を含む。

好ましいh u T F h結合部位ポリペプチド類似物は第1表で示されているアミノ酸残基配列を含んでいる。

第 1 表

名 称 アミノ酸残基配列

a. 各ポリペプチドの実験名は第1図の、含まれているアミノ酸残基配列を表わしている。

ポリペプチド p 26-49、p 145-167及び p 161-189も、抗hуTFh抗体分子がhуTFhに結合するのを中和(競争的阻害)する能力を特徴としている。抗hуTFh抗体のhуTFhへの結合を中和する能力をもつ本発明の他のポリペプチドは、第2表に示されているものである。

第 2 表

名 称 アミノ酸残基配列

a. 実験名に付けられた“C”は、タンパク質結合のためのリンカーとして、示されている配列に付け加えられたシステ

リン。リンキングに使われる典型的アミノ酸残基は、チロシン、システイン、リジン、グルタミン酸及びアスパラギン酸とそれに類するものである。さらに、本発明のポリペプチドは、末端阻害アシル化、例えばアセチレーション又はチオグリコン酸アミデーション、ターミナルカルボキシアミデーション、例えば、アンモニア、メチルアミン、その他により配列が修飾を受けていることで、天然の配列とは異なることがある。

キャリアー・ハプテンのように、当分野でよく知られているリンカーを介してのキャリアーとの結合の場合、本発明のポリペプチドは、hуTFhと免疫反応する抗体を誘導することができる。免疫学的な交差反応性の明白な原則からみて、本発明は、第1表及び第2表で示されているポリペプチドの抗原的に関連したバリエーションも考案している。“抗原的に関連したバリエーション”とは、第1表もしくは第2表のポリペプチドの、少なくとも6個のアミノ酸残基配列領域を含み、かつ、第1表又は第2表のポリペプチド及びhуTFhと免疫反応を起こす抗体分子を誘導することができるポリペプチドのことである。

また、ポリペプチドがリン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散した、hуTFh結合部位ポリペプチド類似物の水性溶液を含む組成物を、本発明は考案している。典型的なリン脂質：ポリペプチド重量比は、約5：1から200：1、好ましくは約30：1-80：1、さらに好ましくは、約45：1-55：1の範囲にある。リン脂質中に分散して使用するのに適している好ましいhуTFh結合部位類似物をセクションIIの第4表にリストした。

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの分野ではよく知られているいくつかの方法で合成することができる。使用しうる多くの技術のすぐれたまとめは、J. H. スチワード (Steward) 及び

ン残基を示している。

本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドが因子W/V/aへの結合に対し、本来の組織因子と競合でき、そして、または、hуTFhに対する抗hуTFh抗体分子の結合を競合的に阻害しうるかぎり、hуTFhのアミノ酸残基配列と同一である必要がないことを理解すべきである。それ故、本ポリペプチドは、使用する際に有利となるような、保存的、非保存的にかかわらず挿入、欠失及び置換のような種々の変化を与えることができる。

保存的置換には、あるアミノ酸残基が他の生物学的に同様の残基に置き換ったものである。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニンのような疏水の残基間の置換又は、アルギニンとリジン、グルタミン酸とアスパラギン酸又はグルタミンとアスパラギン及びそれに類するもののような極性残基間の置換がある。また“保存的置換”という語句には、もし、ポリペプチドが、必要とされる結合活性を示すならば、未置換の元々のアミノ酸の代わりに、置換されたアミノ酸を置換することも含まれる。

本発明のポリペプチドが、1つ以上の保存的、もしくは非保存的置換をしているために、本来のhуTFhの配列と同一ではない場合、本発明のポリペプチドがラベル又は固体マトリックス、又はキャリアーにうまく固定する“リンカー”を提供する目的で、その各末端に付加的残基をつけ加える場合は別にして、アミノ酸残基の通常せいぜい約20パーセント、より普通には、せいぜい10%が置換している。本発明のポリペプチドと共に使用されるラベル、固体マトリックス及びキャリアーは以下に述べる。

通常、アミノ酸残基リンカーは、少なくとも1残基であり、また40以上の残基のこともあり、しばしば1-10残基が用いられ

J. D. ヤング (Young) の“固相ペプチド合成” (1969年、サンフランシスコ、W. H. フリーマン (Freeman) 社) 及びJ. メイエンホーファー (Meyenhofer) の“ホルモン性タンパク質及びペプチド” (1983年、アカデミックプレス社 (ニューヨーク)、2巻、46頁) が固相ペプチド合成について、またE. シュローダー (Schroeder) とK. クプケ (Kobke) の“ペプチド” (1965年、アカデミックプレス社 (ニューヨーク) 1巻) が古典的な液相法について行なわれている。

B. 接種物

別の態様において、本発明のポリペプチド又は、その抗原的に関連したバリエーションは、生理学的に許容しうる水性希釈液成分として、その効果的量が投与された時、hуTFhと免疫反応する抗体を誘導することができる接種物となる。種々の文法型の“接種物”という語は、hуTFhに対する抗体の調製に用いられる活性成分として、本発明のポリペプチドを含む組成物として、ここで使用されている。ポリペプチドの抗体を誘導するのに用いられるとき、そのポリペプチドは、単独で、又は結合体としてキャリアーと結合して、又は、ポリペプチド重合体として用いられるのであるが、表現の簡便性のため、本発明のポリペプチドの種々の態様は、全て、“ポリペプチド”という語及びその種々の文法型で呼ばれていることを理解されよう。

約35以下のアミノ酸残基を含むポリペプチドに対し、すでに記されているように抗体生産の誘導のためには、キャリアーに結合したペプチドを使用する方が望ましい。

すでに記してきたように、1つ以上の付加的アミノ酸残基をポリペプチドのキャリアーへの結合を助けるため、そのポリペプチドのアミノ又はカルボキシ末端に付加することができる。ポリペ

ブチドのアミノ又はカルボキシ末端へ付加したシステイン残基は、ジスルフィド結合を介して、結合体を作るのに特に有用であることが分っている。しかし、結合体を調整の当分野でよく知られている他の方法も使用しうる。代表的付加結合法にはミカエル付加反応産物、グルタルアルデヒドのようなジアルデヒド（クリプスタイン（Klipstein）等（ジャーナル・オブ・インフェクシヤス・デシーズ（J. Infect. Dis.）、147巻、318～326頁、

（1983年））及びそれに類するものの使用、又は、キャリアーに対し、アミド結合を生ずる、水溶性カルボジイミドの使用のような、カルボジイミド法の使用が含まれる。活性官能基を介してのタンパク質の結合については、オーラメアス（Aurum）等のスカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー（Scand. J. Immunol.）8巻、補1、7、7～23頁（1978年）を参照せよ。

有用なキャリアーは、当分野ではよく知られており、一般的にはタンパク質そのものである。そのようなキャリアーの代表例としては、キーホール、リンペット、ヘモシアニン（KLH）、エデスチン、チログロビン、子ウシ血清アルブミン（BSA）やヒト血清アルブミン（HSA）のようなアルブミン類、ヤギ赤血球（SRBC）のような赤血球類、チタナストキソイド、コレラトキソイド、ポリ（D-リジン；D-グルタミン酸）のようなポリアミノ酸及びこれに類するものがある。

キャリアーの選択は、その接種物の最終的使用法に依存しており、本発明に特に関係しない基準に基づいている。例えば、接種される動物中で不都合な反応を起こさないキャリアーが選択されるべきである。

本発明の接種物は、典型的には、キャリアーに結合した結合物

ビイムノグロブリン分子の免疫学的に活性な領域すなわち抗体結合部位又はパラトープを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来のイムノグロブリン分子、實質的に本来のものと同じイムノグロブリン分子及びFab、Fab'、F(ab')₂、及びF(v)として、当分野で知られている領域を含む、パラトープを含有する、イムノグロブリン分子の一部がある。

本発明の抗体組成物は、h u T F h 及び本発明の特異的ポリペプチドの少なくとも1つと免疫反応を起こす抗体分子を含むことを特徴とする抗ペプチド抗体である。

例えば、h u T F h 及び組織因子結合部位のポリペプチド類似物と免疫反応する抗体分子を含む、本発明の抗体組成物は組織因子が因子Ⅴ/Ⅴ_aと結合する能力を中和できる。従って、好ましい抗体組成物は、h u T F h 及びp 26-49又はp 146-167と反応し、かつ、p 204-226と實質的に免疫反応しない抗体分子を含むものである。h u T F h に対して生ずるモノクローナル抗血清は、p 204-226と免疫反応する抗体を含むことに注意すべきである。このように、抗204-226免疫反応性が實質的にないことが、本抗体組成物と従来の報告されているものとを区別する特性となっている。

本発明の抗体組成物の典型的生産は、水乳動物を、本発明の接種物で免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有する水乳類抗体分子を誘導することによって行なわれる。さらに、その抗体分子をその水乳動物から収集し、例えば、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーのような従来技術によって、その必要量を単離する。このように生産した抗体組成物は、なにかんずく、診断法及び身体サンプルにおけるh u T F h を検出するための、本発明のシステムで用いることができる。

として、効果的な免疫原量の本発明のポリペプチドを含む。他の事項の中で、単位投与量当りの効果的なポリペプチド量は、当分野ではよく知られているように、接種される動物種、その動物の体重及び選択した接種レジメンに依存する。典型的に、接種物は、接種（投与）当り約10マイクログラムから約500ミリグラム、好ましくは、約50マイクログラムから約500ミリグラムのポリペプチドを含んでいる。

本発明の接種物に用いられている“単位投与”という語句は、各ユニットが、必要とする希釈剤、すなわち、キャリアー又はビヒクルと共に望ましい免疫原的効果を産むのに必要な予め決められた量の活性物質を含む、動物に対する1回の投与に適した物理的に分離した単位を意味する。本発明の接種物の新しい単位投与に関する明細は、(i)活性物質の独特な特性及びその独自の免疫学的効果、及び(ii)ここで詳細に公開されている動物中での免疫学的使用に内在する制限により説明され、かつ直接依存しており、これらが本発明の特徴となっている。

典型的には、接種物は、水、食塩水又はリン酸緩衝食塩水などの生理学的に許容された（受容できる）希釈剤中にポリペプチド-結合体を分散させることにより、乾燥した固体のポリペプチド結合体から水性組成物を調整することができる。

また、接種物は希釈剤の一部として、アジュバントを含んでいる。完全フロイントアジュバント（CFA）、不完全フロイントアジュバント（IFA）及びミョウベンのようなアジュバントは、当分野ではよく知られており、いくつかの会社から市販されている。

1. 抗体及び抗体組成物

種々の文法型の“抗体”という語は、イムノグロブリン分子及

モノクローナル抗体組成物も、本発明で考慮されている。検出限界内で、モノクローナル抗体組成物は、効果的にh u T F h を結合しうる、唯一種類の抗体結合部位を含んでいる。従って、典型的に、本発明のモノクローナル抗体組成物は、それがh u T F h 以外のタンパク質を結合できる抗体をたとえ含んでいたとしても、h u T F h への結合親和性を示す。ひとつの態様において、モノクローナル抗体組成物は、h u T F h 及び組織因子結合部位のポリペプチド類似物、好ましくはp 26-49又はp 146-167と免疫反応する抗体分子を含んでいる。

他の態様において、本発明は、h u T F h と免疫反応し、h u T F h により開始する凝集を阻害する抗体分子を含む抗凝集（中和）MoAbを考案した。さらに凝集を阻害する好ましいMoAbは本発明のポリペプチド、好ましくは、h u T F h 結合部位ポリペプチド類似物、及びさらに好ましくは、第1表で示されているポリペプチドと免疫反応することを特徴とする。

他の態様において、抗凝集MoAbは、h u T F h 及びh u T F h : 因子Ⅴ/Ⅴ_aの複合体と免疫反応し、h u T F h によって開始する凝集を阻害（中和）する抗体分子を含んでいる。さらに、好ましい抗凝集MoAbはh u T F h ポリペプチドp 1-30又はp 26-49と免疫反応することを特徴とし、またこれは、h u T F h ポリペプチドp 56-71と免疫反応しないことが好ましい。

また、本発明は、組織因子の凝集を開始する能力を中和しない抗体分子を含む非中和性モノクローナル抗体組成物も考案した。そのような組成物は、h u T F h 及びポリペプチドp 1-30と免疫反応し、かつ、ハイブリドーマT F 9-10 H 10により生産（分泌）される抗体分子を含むことが望ましい。

本発明のモノクローナル抗体組成物は、適当なポリペプチド特

異性をもつ抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培地を含む、モノクローナルハイブリドーマの培養を開始することによって生産することができる。

このハイブリドーマが培地中に、その抗体分子を分泌するのに十分な条件及び時間、培養を維持する。それから、抗体含有培地を収集する。さらにこの抗体分子を従来法により単離する。

これらの組成物の調製に有用な培地は、当分野ではよく知られておりまた、市販されていて、合成培養培地、阿血統系マウス及びそれに類するものが含まれている。代表的合成培地は、4.5 g/lのグルコース、20 mgグルタミン及び20%ウシ胎児血清を補足した、ダルベコ最小培地 (DMEM; ダルベコ (Dulbecco) 等、ヴィロロジー (Virology)、8巻、396頁 (1959年)) である。代表的阿血統系マウス株はBalb/cである。上述の方法で生産したモノクローナル抗体組成物は、例えば、h u T F h 含有免疫反応の形成が必要である、診断及び治療法で用いることができる。

J. ハイブリドーマ

本発明のハイブリドーマは、h u T F h と免疫反応する抗体分子を生産することを特徴とする。さらに、好ましいハイブリドーマは、h u T F h で開始する癌腫を阻害し、また、望ましくは、本発明のポリペプチド、好ましくは、h u T F h 結合部位ポリペプチド類似物、そしてさらに好ましくは、第1表に示されているポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴としている。さらに好ましい態様においては、抗癌腫 M o A b は、非ヒト、霊長類、T f と免疫反応する。

他の好ましい態様において、本発明のハイブリドーマは h u T F h 及び h u T F h ; 因子 V / V a の複合体と免疫反応し、h u T F h

V a 複合体形成速度の減少によると考えられている。従って、生体内において、h u T F h 因子 V / V a 結合部位ポリペプチド類似物の投与は、癌腫やある炎症反応のような、組織因子の因子 V / V a への結合により開始する生理学的応答を調節するのに用いることができる。好ましい態様において、このポリペプチドは、先に述べたように、リン脂質中に分散して投与される。

生体内における組織因子による因子 V / V a の結合を調節する他の方法は、本発明の抗体組成物 (抗ペプチド抗体) 又は抗癌腫 M o A b の効果量を静脈注射により投与することである。この抗体分子は、パラトビック領域を含み、かつイムノグロブリン分断片 F (ab')₂、Fab 及びそれに類するもののような、Fc 領域を含まないものである。治療的に効果的な抗癌腫 M o A b は、体重当たり 15 µg から 5 mg、好ましくは体重当たり、約 100 µg から約 1 mg、より好ましくは、体重当たり約 150 µg から約 500 µg の範囲である。

他の態様において、本発明の M o A b、抗癌腫 M o A b 又は非中和性 M o A b の抗体分子を抗腫瘍試薬に結合し、抗腫瘍治療組成物が作られる。このようにして作った、効果量の抗腫瘍治療組成物を、その表面に組織因子を発現する腫瘍細胞を有する被験者に投与することができる。このような腫瘍細胞の代表例は、胸及び肺のがん細胞である。

ここで考案された抗腫瘍試薬の代表例には¹²⁵I、¹³¹I、²¹³Bi 及びこれに類するもののような放射性核種がある。放射性核種結合モノクローナル抗体治療組成物の製造法及びその使用法は、コザック (Kozak) 等 (トレンズ・イン・バイオテクノロジー (Trends in Biotech.)) 4巻、259~264頁 (1986年)) により報告されている。

により開始する癌腫を中和する抗体分子を生産する。さらに、h u T F h ; 因子 V / V a の複合体と免疫反応するハイブリドーマ生産抗体は、該抗体の、h u T F h ポリペプチド p 1-30 又は p 26-49、好ましくはその両方と免疫反応し、かつ、より好ましくは、該抗体分子が、ポリ h u T F h ポリペプチド p 56-71 とは免疫反応を起こさないことを特徴としている。

望ましい免疫特異性を有する、すなわち、特別なタンパク質として、またはポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産する (分泌する) ハイブリドーマの作成法は、当分野ではよく知られている。特に、ニマン (Niman) 等により報告されたハイブリドーマ技術は (プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、80巻、4949~4953頁 (1983年))、有用である。好ましいハイブリドーマを、例13の第5表に示した。

ハイブリドーマ培養物 T F 8-5 G 9、T F 9-5 B 4 及び T F 9-10 H 10 はブタベスト協定に従い、1987年3月27日 ATCC に保管され、各々受託番号、H B 9 3 8 2、H B 9 3 8 1 及び H B 9 3 8 3 が割当てられた。

K. 治療方法及び組成物

本発明の h u T F h 因子 V / V a の結合部位ポリペプチド類似物、抗体組成物、モノクローナル抗体組成物及び抗癌腫 M o A b は各々、生体内において、組織因子による因子 V / V a の結合を調節するのに用いることができる。

例えば、h u T F h 因子 V / V a の結合部位ポリペプチド類似物は、効果量を被験者に投与したとき、因子 V / V a の組織因子への結合を競争的に阻害することができる、医薬的に許容しうる組成物に用いることができる。この阻害は、組織因子-因子 V /

投与されたポリペプチド又は抗体分子含有組成物は、溶液又はサスペンションの形をしているが、ポリペプチドは、錠剤、丸薬、カプセル、放出持続錠剤又は粉末の形もとる。どの場合にも、この組成物は、0.10%~95%、好ましくは、2.5%~70%の活性成分を含んでいる。

活性成分としてポリペプチド又は抗体分子を含む治療組成物の調製は、この分野ではよく知られている。典型的には、このような組成物は、液体溶液又はサスペンションのような注射可能な形に調製されるが、注射前の液体溶液又はサスペンションを作るのに適している固体形としても調製される。またこの調製物はエマルジョン化されることもある。この活性治療成分は、しばしば、医薬的に許容でき、かつ、活性成分に適合する賦形剤と混合する。例えば、典型的賦形剤としては、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール又はそれらに類するものと及びこれらの組合せたものがある。加えて、もし、望ましいなら、この組成分は、加湿剤又はエマルジョン化剤、pH 緩衝剤のような、活性成分の効果量を促進する補助物質を少量含ませることも可能である。

ポリペプチド又は抗体分子組成物は、中和した医薬的に受容しうる塩の形に調整することもできる。医薬的に受容しうる塩には、酸付加塩 (ポリペプチド又は抗体分子の遊離しているアミノ基で形成される) 及び、例えば、塩酸又はリン酸のような無機酸又は、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸及びこれらに類するもので形成されるものがある。遊離したカルボキシル基で形成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は鉄の水酸化物のような無機塩基及びイソプロピルアミン、トリノチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン及びこれらに類するもののような有機塩基か

ら読取される。

治療用のポリペプチド又は抗体分子含有組成物は例えば、単位投与量の注射によるように、局所的に又は静脈注射により簡便に投与される。

本発明の治療組成物に対して用いられる“単位投与”という語句は、ヒトに1回投与するのに適した、必要とされる各薬剤、すなわち、キャリアー又はビヒクルと共に、望ましい治療効果をあげるために計算された、予め決められた量の活性物質を含む、物理的に分離されている単位を意味する。

該組成物は、投与物形状に適した方法で、治療的に効果的な量が投与される。投与される量は処置される機体、活性成分を利用する機体の血液循環システムの容量及び望ましい組織因子結合能の阻害又は中和度に依存する。投与される必要のある活性成分の精密な量は、医師の診断に依存し、かつ、各個人によっても異なる。しかし、適当なポリペプチド投与範囲は、1日に、患者当たり、1から5ミリグラムの活性物質というオーダーであり、投与の経路に依存する。第1回投与及び二次免疫の適正な治療計画もいろいろであるが、典型的には、一次投与後、1時間以上の間隔において、さらに注射又は他の方法による投与が繰り返される。別に、血液中、10ナノモル濃度から10マイクロモル濃度を維持するのに十分な、持続的静脈注入性も考慮されている。

1. 診断システム

本発明のキット型の診断システムは、少なくとも1回の検定に十分な量の、分包試薬として、本発明の発現タンパク質ポリペプチド、抗体組成物又はモノクローナル抗体組成物を含んでいる。また、この分包試薬の使用説明書も含まれているのが普通である。典型的に、“使用説明書”には、試薬濃度には、混合する試薬

とサンプルの相対量、試薬/サンプル混合物の維持時間、温度、パッファ条件及びそれに類するもののよう、少なくとも1回の検定法のパラメーターを明確に記述してある。

好ましい態様において、さらに、本発明の診断システムは、試薬を含む複合体の形成を知らせるラベル又は指示手段を含んでいる。

ここで用いられているように、種々の文法型の“ラベル”及び“指示手段”は、複合体の存在を示す検出可能な信号を産み出すのに直接又は間接的に関連する単一の原子及び分子を意味する。“生体内”ラベル又は指示手段とは、被検者の体内で有用なものである。どのラベル又は指示手段も、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物の一部である抗体分子、発現したタンパク質、又はポリペプチドに結合又は組込まれていることもあるし、また別々に使用されることもあり、また、これらの原子又は分子は付加的試薬と組合せて、又は単独で使用されうる。このようなラベルは、臨床的診断化学においては、よく知られているものであり、それらが、他の新しいタンパク質、方法、そして、又はシステムとともに使用されるときに限り、本発明の一部を構成する。

ラベルの結合、すなわち、ポリペプチド及びタンパク質のラベル化は、当分野ではよく知られている。例えば、ハイブライドマによって生産される抗体分子は、培養増殖中の成分として与えられたとき、放射性同位元素含有アミノ酸の代謝的取込みによるラベル化が可能である。例えば、ガルフレ (Gulfre) 等の、メソグズ・イン・エンザイモロジー (Meth. Enzymol.) 73巻、3~45頁 (1981年) 参照。活性化官能基を介するタンパク質の結合又はカップリング技術は特に有用である。例えば、オーラメアス (Aurameas) 等の、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ

イムノロジー (Scand. J. Immunol.) 8巻、補版7巻、7~23頁 (1978年)、ロッドウェル (Rodwell) 等の、バイオテクノロジー (Biotech.)、3巻、889~894頁 (1984年) 及び米国特許第 4,493,795号参照。

また、診断システムは、好ましくは分包の、特異的試薬を含む。“特異的結合試薬”は、本発明の試薬を選択的に結合できる分子であるが、本発明のタンパク質発現産物、ポリペプチド又は抗体分子そのものではない。代表的な特異的結合試薬は、抗体分子、補体タンパク質又はその断片、タンパク質A、血液凝固因子Ⅷ/Ⅷa、子ウシ組織因子及びそれに類するものがある。この特異的結合試薬は、反応物が複合体の一部として存在するとき、これと結合することが望ましい。

好ましい態様において、特異的結合試薬はラベル化される。しかし、その診断システムが、ラベル化されていない特異的結合試薬を含むとき、典型的には、この試薬は、増巾手段又は試薬として用いられる。これらの態様において、このラベル化した特異的結合試薬は、この増巾手段が、反応種含有複合体に結合しているとき、この増巾手段に特異的に結合することができる。

本発明の診断キットは、血清、血漿又は尿のような体液サンプル中のhCTFhの存在又は量を検出するのに“イライザ”方式で用いることができる。“イライザ法”は、サンプル中に存在する抗原又は抗体量を検出及び定量するための、固相に結合した抗体又は抗原及び酵素-抗原又は酵素-抗体結合物を用いた、酵素結合免疫吸着検定法のことである。イライザ法の説明は、全て参考としてここに記述されている。1982年、CA州ロサンゼルスラング・メディカル・パブリケーションから出版された、D. P. サイト (Sites) 等の基本的及び臨床的免疫学、第4編、

第22章及び米国特許第3,654,080号、第3,850,752号及び第4,016,043号に報告されている。

このように、好ましい態様において、本発明の発現したタンパク質、ポリペプチド又は抗体は固相マトリックスに固定され、この診断システム中に、分包されている固体サポートを形作っている。

典型的に、この試薬の固体マトリックスの固定は、他の固定法もあるが、この分野でよく知られている水性媒体からの吸着が用いられている。

有用な固体マトリックスは、当分野でよく知られている。このような物質には、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社 (NJ州、ピスカタウェイ) から、セファデックスという登録商標で市販されている、架橋デキストラン；アガロース；IL州、北シカゴ、アボット・ラボラトリーズ社から市販されている直径約1ミクロン〜約5ミクロンのポリスチレンビーズ；シート状、ヒモ状又はへら状のポリ塩化ビニルポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロース又はナイロンベースの織物、又は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニルでできているチューブ、プレート又はマイクロプレートのウェルが含まれる。

ここで述べられている診断システムの試薬、ラベル化結合試薬又は、増巾試薬は、液体分散物として溶液として、又は、例えば、凍結乾燥型のような、実質的に乾燥粉として提供される。指示手段が酵素である場合、この酵素基質も、システムの別の包に提供される。先に述べた、マイクロプレートのような固体サポート及び1つ以上のパッファも、この診断決定システム中に別にパッケージされた要素として含まれている。

診断システムに関連して、ここで議論されているパッケージは、

診断システムにおいて通常使われるものである。このようなパッケージには、ガラス及びプラスチック製の（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリカーボネート）ボトル、バイアル、プラスチック及びプラスチックホイルでラミネートした外袋物及びこれらに類するものが含まれている。

B. 検定法

本発明は、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物中に含まれている、発現されたタンパク質、ポリペプチド又は抗体分子を含む複合体を生産することによりh u T F hを検出する方法を考案した。当業者には、これらの複合体を形成するのに利用できる多くの、よく知られている臨床的診断の化学手段があることが理解できよう。従って、典型的検定方法がここで説明されているが、これは、本発明を制限するものではない。

1. 血柱検出

被検者中に存在する血柱検出法が考案された。生体内での指示手段と結合する抗体を含む本発明の、効果的量のモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈注射する。好ましい態様において、ラベル化した抗体は、h u T F h及び第1表及び第2表のポリペプチドと免疫反応するがp 204~226とは反応しないもので、好ましくはハイブリドーマT F 8-509、T F 9-5 B 4又はT F 9-10 H 10から生産されたものである。

それから被検者を、ラベル化した抗体分子が、血柱の一部に存在するh u T F hと反応し、複合体を作るのに十分な決められた時間、及び、好ましくは、未反応の抗体分子が体内から一掃されるのに十分な付加的時間維持する。その後、被検者を、生成した複合体の存在及び好ましくはその位置について検定する。

2. 身体サンプル中のh u T F hの検出

ートした。

その後、残留組織塊を各々、その固体をヘプタン：ブタノール（2：1）25ミリリットル（m l）当たり、組織塊1gの割合で、ヘプタン：ブタノール（2：1）と混合することによって行う5回の抽出を行ない、ついで濾過により、その固体を回収する。最後の濾過後、残留組織塊を再び大気圧下、約20℃で一晩で乾燥し、脱脂組織粉末を作り、必要になるまで、-80℃に保存する。

つづいて、組織粉末25グラムをT S / E D T Aバッファ（100ミリモル濃度（m M）NaCl、50m M トリス・塩酸（pH 7.5）、0.02%アジ化ナトリウム、5m M エチレンジアミン四酢酸（E D T A）、0.1%（V/V）トリトンX-100（ポリアリルエチレン-9-オクチルフェニルエーテル）500 m lと混合し、ついで4℃で一晩維持する。さらにこの混合物を15,300×gで1時間遠心する。生じたペレットを500 m lのバッファA（100m M NaCl、50m M トリス・塩酸（pH 7.5）、0.02%アジ化ナトリウム、2%トリトンX-100）に再懸濁し、スラリーを作る。室温で1時間の置換後、このスラリーを上述のように遠心する。生じた上清を回収し、液乾乾燥した後、100 m lのバッファAに溶かして、h u T F h含有抽出液を作製する。

2. h u T F hの凝集活性を測定するための凝集検定法

h u T F hプロコアグラント活性を、37℃に維持した、全試薬及び混合物を用いて行う、1段階凝集検定法で測定した。血液と同容積の、20m M クエン酸ナトリウム2水和物及び140m M NaCl（pH 7.4）を含む溶液を混合することにより、正常なヒト血液をクエン酸化した。T B S / B S A溶液（150m M NaCl、

身体サンプル、好ましくは血液サンプル中のh u T F hの存在、及び好ましくはその量を検出するため、競合的又は非競合的な、種々の不均一及び均一検定法が利用できる。例えば、液体血液サンプルと、ラベル化したp 26-49を、マイクロプレートのウェルの内壁に固定した、ハイブリドーマT F 8-509又はT F 9-10 H 10から生産された抗体分子を含む固体サポートと混合し、固液相免疫反応混合物を作る。この混合物をサンプル中に存在するh u T F h及びラベル化したp 26-49が、固体サポートとして存在する抗体分子への結合を競争し、固相免疫反応産物を形成するのに十分な時間、生物学的検定条件下に維持する。未結合のラベル化p 26-49を、免疫反応産物から取り除く。その後、免疫反応産物として結合したラベル化p 26-49の量を測定し、その量により、h u T F hの存在を検定できる。

例

次に示す例は、本発明の説明を意図したもので、これを制限するものではない。

1. 組織因子含有ヒト抽出物の調製

生検で得られた正常なヒトの臓を12時間以内に処理するかもしくは、-80℃に保存する。その臓及び大腸を除き、ついで残存する臓部分を、ポリトロンホモジナイザー（N Y、ウェストバリー、プリングマン、インスツラメント社）を用いて、等容量の冷（0℃）アセトン中でホモジネートした。このホモジネートしたものをさらに3倍容の冷アセトンと混合し、その組織固体部分を、凍結ガラスロートを用いて濾過して回収した。各々7回の2倍容の冷アセトンとの混合及び引きつづき濾過により、残留固体からアセトン可溶性物質を抽出した。最後の濾過後、残存するアセトンを、20℃、一晩、残留固体から大気圧下でエバポレ

50m M トリス・HCl（pH 7.5）、0.1%ウシ血清アルブミン）で希釈したh u T F hを含むサンプル100マイクロリットルを、100m lのクエン酸化血液と混合した。25m M CaCl₂溶液100m lを混合し、凝集反応混合物を作り、凝集が始まるまでゆっくりと揺らした。CaCl₂添加と、凝血形成の間の時間を測定した。それから、h u T F h活性の標準曲線を、秒で示した凝集時間と希釈率をプロットすることにより作った。代表的標準曲線を第3図に示した。

3. h u T F hの凝和性単離のための、因子V含有固体サポートの調製

ヒトの因子V/V_aを参考文献として送達されている、フェア（Fair）の報告（ブラッド（Blood）、62巻、784~91頁（1983年））に従って単離した。この単離した因子V/V_aを、アガロース固体マトリックスに結合するため、4℃で一晩、その5ミリグラム（mg）を、0.1M 2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）（pH 6.5）に対して透析した。塩化カルシウムを最終濃度1m Mとなるように添加した。それから因子V/V_aを4m lのアファゲル-15活性化アガロースビーズ（CA州、リッチモンド、バイオラド・ラボラトリーズ社）と混合し、生じた結合反応混合物を、製造業者が推奨するもの（バイオラド）に従って4℃、4時間の回転処理を行った。

固体サポート上の過剰タンパク質結合部位を、その固体サポートを、0.1M グリシンエチルエステル中、室温で1時間維持することにより、ブロックした。その後、この固体サポートを、凍結ガラスロート上各約20m lのD バッファA、0.1M NaClを含むバッファA、0.5M E D T A含有バッファA及び0.1M NaCl、含有バッファAをこの順序で用いて洗浄した。それか

ら過剰の液体を減圧下で除去、半乾燥状の粒子物質（ケーキ）を作った。

4. h u T F の因子Ⅷ／Ⅷ因子性による単離

0.1 M のグリシンエチルエステル及び 0.1 M M E S (pH 6.5) を含む 20 ml の溶液を、2.25 ml のアフィゲル-15 アガロースビーズ（バイオラフ）と混合し、結合反応混合物を作る。この結合反応混合物を室温に 1 時間維持する。この生成した結合物を、焼結ガラスロート上、10 倍容のバッファを用い、減圧下で濾過することにより洗浄し、グリシンエチルエステル-アガロースケーキを作る。

例 1 で調製した 30 ml の抽出溶液を、1 M 塩化カルシウムを含む 6 リットルのバッファ A に対し、4℃、1 晩透析を行う。透析した抽出物を、グリシンエチルエステル-アガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら室温で 2 時間維持した後、この固液相を焼結ガラスロートを用いて濾過することで分離する。この液相を回収し、最終濃度 2 ml 当たり 10 ユニットとなるようにトラシロール（MO 州、セントルイス、シグマケミカル社、アプロチニン）と混合する。この回収した液相を例 3 で調製した因子Ⅷ／Ⅷ因子-アガロースケーキと混合し、第 2 の固液相混合物を作る。

この混合物を回転しながら、一晩 4℃に維持し、h u T F-因子Ⅷ／Ⅷ因子含有固相産物を形成させる。その後、この固相及び液相を先に述べたように濾過により分離する。焼結ガラスロート上に残留物する固相を 1 M 塩化カルシウムを含む バッファ A 25 ml で洗浄した。さらに、この固相を焼結ガラスクロマトグラフィーカラム (0.5 × 15 cm、バイオラフ) に移し、6 ml の同洗浄バッファで洗浄した。上記の洗浄後、この固体サポートに結合

した h u T F を、焼結ガラスカラム上に保持されている固体サポートを 5 M の E D T A を含む バッファ A で洗浄することにより、遊離（溶出）させる。溶出した物質を 1 ml 毎分づつ回収し、各成分について、例 2 で述べた方法により、h u T F の存在を検定した。h u T F 含有成分を凝縮し、4℃で、1% トリトン X-100 を含む 6 リットルの T B S (150 mM N a C l、150 mM トリス塩酸、pH 7.5) に対して 1 晩透析した。

このようにして作った透析物をつづいて、4 倍容の冷アセトンと混合し、h u T F タンパク質を沈殿した。この沈殿をおよそ 10℃、5000 × g、30 分間の遠心で集めた。生成したペレットを真空乾燥管気下で乾燥した。典型的な収量は、乾燥した乾燥凝縮粉末 1 グラム（乾燥重量）当たり、2 μg の h u T F であった。

このようにして生じた単離 h u T F サンプルを T B S / トリトン中に懸濁し、ついで、製造業者の指示に従がい（I L、ロックフェード、ピラス・ケミカル社）、ロードゲンを用い、Na¹²⁵I でラベル化した（I L 州、アーリントンハイフ、アマーシャム社、マイクログラム当たり 16 マイクロキュリー）。ラベル化後、過剰の未反応¹²⁵I を T B S / トリトンを用いたセファデックス G25 (N J、ピスカタウェイ、ファルマシア社) での脱塩クロマトグラフィーにより、ラベル化した h u T F から分離した。

¹²⁵I ラベル化 h u T F 含有サンプルのラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による (S D S - P A G E) 評価は、レムリ (Lemli) (ネイチャー (Nature)、227 巻、680~685 頁 (1970 年)) の方法に従った。還元条件下で評価するサンプルに対しては、100 mM のジチオスレイトールを、サンプルバッファ中に含有させた。1% トリトン X-100、50 mM トリス塩酸 (pH 7.4)、150 mM N a C l 中の¹²⁵I

h u T F を、10 分の 1 容の T F 8-5 G 9 又は P A b 100 (A T C C - T I B 115; ここでネガティブコントロールとして用いられている S V 40 ラージ T 抗原特異的抗体を生産するハイブリドーマ) ハイブリドーマ培養上清とともに、4℃で 1 晩インキュベートすることにより免疫沈殿化を行った。アガロースビーズ (MO 州、セントルイス、シグマ・ケミカル社) 上に固定したヤギの抗マウス IgG を、その第 1 次免疫反応産物を吸収するのに用いた。このビーズを同バッファでよく洗浄し、結合した¹²⁵I-h u T F を、D T T 存在下又は非存在下、同バッファ中で 5 分間煮沸することにより溶出した。S D S - P A G E 後、タンパク質バンドはオートフルオログラフィーで可視化した。

単離した h u T F を放射性ヨウ素化し、D T T で還元し、ついで 10% アクリルアミドゲルで S D S - P A G E 分析したとき、47 kD の見かけの分子量をもつ単一のメインバンドが観察された（第 4 図）。しかし、未還元 h u T F を同様に分析した場合は、およそ 58 kD 及び 47 kD の 2 つのバンドが相対的に等しい量で観察され（第 5 図レーン B）、このことは、少なくとも 2 つの異なる多量体の存在を示している。

非還元で観察されるこの 2 つのバンドに対する説明としては、その大きな方、すなわち、泳動が遅いバンドは、非常に多くのグリコシル化を受けたものか、付加的なプロセッシングを受けていないタンパク質を有しているのか、又は、付加的な、ジスルフィド結合で結合したポリペプチドと会合しているのかもしれないというものである。還元後の単一バンドの存在は、はじめの 2 つの示唆と一致している。その後者の可能性は中ても一層大きいように見えるが、その小さいサイズの差のために、付加的ポリペプチドは、色素の場所又はその付近に泳動するような十分小さいも

のらしく、還元後、10% アクリルアミドでは分離されないであろう。15% のポリアクリルアミドゲルの還元及び非還元 h u T F の電気泳動は、単一の分離した経路を示すのには失敗したが、いくつかの少量の、遅く泳動するバンドが観察された（第 5 図、レーン A 及び B）。これらの小さい、少量のポリペプチドは、以前に報告されているように（ブローズ (Broze) 等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、260 巻、10817~20 頁 (1985 年) 及びグハ (Gha) 等、プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) U S A、83 巻、299~302 頁 (1986 年))、汚染物を示している。この可能性を明らかにするため、47 kD 及び 58 kD のバンドは非還元ゲルから切り出され、その各々を、ジチオスレイトールで還元し、その各々を、15% アクリルアミドゲルを用いた S D S - P A G E にかけた（第 5 図、レーン C 及び D）。58 kD タンパク質は 125 kD 経路及び 47 kD 重鎖であると分った。47 kD のタンパク質を分析したとき、同分子量の重鎖のみが観察された。このように、両者は、S D S - P A G E で同様の挙動をもつ重鎖を保有していた。

直接経路の存在を示すため、¹²⁵I-h u T F を、h u T F 特異的モノクローナル抗体 T F 8-5 G 9 で免疫沈殿化し、それを還元剤存在下の電気泳動にかけた。主要な 47 kD バンドがおよそ、125 kD の分離したバンドとともに観察された（第 6 図、レーン A）。還元化しないサンプルの電気泳動でおよそ 47 kD 及び 58 kD のバンドを生じたが、低い分子量のポリペプチドは生じなかった（第 6 図、レーン B）。また非還元 h u T F の電気泳動は、ブローズ (Broze) 等（ジャーナル・オブ・バイオ

ロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 260巻: 10917~20頁 (1985年)) により示唆されているh u T F 重鎖のダイマーと一致する、少量の90kDaタンパク質も示した。

h u T F 軽鎖が重鎖からタンパク質の分解によって生ずるといふ可能性を研究するため、SDS-PAGEにより単離した軽鎖及び重鎖を、N末端アミノ酸配列分析にかけた。

重鎖及び軽鎖をSDS-PAGEで分離し、アバーソールド (Abercald) 等の高pH法 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 261巻: 4225~4238頁 (1986年)) を用い、活性化した、アミノ液置ファイバガラスフィルター上に電気プロットした。このタンパク質バンドを、蛍光染料 (アバーソールド (Abercald) 等、上記) により、このプロットを可視化し、切り出し、そして、まだファイバガラスに結合したまま、PTH誘導体のオン・ラインHPLC分析を用いたアプライド・バイオシステムズ470Aタンパク質シーケンサーで配列決定した。別にタンパク質バンドをコマーシブルによる染色によりゲルを可視化し、シーケンシングのために、電気泳出した。両方法とも等しい結果を与えた。

h u T F 重鎖のマикроシーケンシングは、ほぼ等モル量のアミノ酸配列で一致した結果となった。ほとんど全ての場合、各アミノ酸残基は2サイクル離れて、2度出現する。これは、長さがN末端で2残基異なるh u T F 重鎖の2つのバリエーションが混じったN末端をもつことの明白な証拠である。大きい方のバリエーションのN末端は、非特定のアミノ酸Xを含む

Ser-Gly-X-Ile-Thr-Val-Ala-Ala-Ile-Lys-Thr-Trp-Lys-serであることが誘導された。

軽鎖の配列決定するいくつかの試みは、ブロックされたN末端

と一致して、なんら配列の情報を与えなかった。しかし、h u T F の重鎖及び軽鎖は、単離されたh u T F に対して生じた、2つのウサギの抗h u T F 抗血清及び28個の、マウスモノクローナル抗体の全てが、重鎖のみに結合することが分かっていることから、抗原的に全く別のものである。それゆえ、軽鎖は、重鎖のタンパク質分解断片とは考えにくい。さらに軽鎖は、ベーター、ミクログロブリンに対する抗血清とは反応しなかった。

現在、12.5kDaのh u T F 軽鎖の意味は知られていない。それは、単一の、独立した分子種なので、ランダムなジスルフィド交換による、単離の際にアーティファクトとして誘導されたものでもないようだ。還元なしに、既和性による単離を行ったh u T F をSDS-PAGEにかけたとき、h u T F 軽鎖は、58kDaと47kDaの分子量に対応するゲルから泳出した。これら2つの分子量に対応するh u T F 軽鎖も、粗脂又は部分的に単離した胎盤の抽出物を、SDSゲルの電気泳動にかけたとき (データ示さず) も検出された。全ての場合において、その活性は、因子Ⅲ依存で、このことは、h u T F 特異的活性を示している。これらの知見は、h u T F のみが因子Ⅲを活性化でき、かつ、軽鎖はこの機能に必要なことを示している。

軽鎖がh u T F 重鎖のおよそ半分のみにジスルフィド結合していることは興味深い。生体内で、h u T F の重要な領域に不在なのか、存在するのとは別に、界面活性剤で分解される、非共有相互作用を介して金合しているのであろう。軽鎖は、サイズが小さく、SDS-PAGEの際にマーカー色素の部分に泳動してしまいうため、また、h u T F の報告されている分析例が還元後行なわれていることから、初期の研究では気づかれなかった。現行の既和性を用いた方法で単離することができる制限された量では、

タンパク質染色によって、金合した小ポリペプチド鎖を検出することは困難である。

イン・ビトロでは、単量体h u T F が凝集を開始するにもかかわらず、h u T F による凝集の生理的開始は、細胞表面で起こる。軽鎖は、直接的凝集決定法で検出することができる。h u T F 軽鎖又は軽鎖において重要な役割をはたしていることが推察できるであろう。例えば、軽鎖は、因子Ⅲ/Ⅳの組織因子への結合の正の協同性を説明すると仮定されている、因子Ⅲに対する2つのサブユニットレセプターのアセンブリーに関与している可能性がある。別に、細胞表面上の構造ドメインでのh u T F の機構及び、細胞表面上でのh u T F 活性の制御は、h u T F 軽鎖に仲介されるのかもしれない。

N結合オリゴ糖の役割は、¹²⁵I-h u T F サンプルの脱グリコシル化により試験した。軽分およそ3.6×10⁵ カウントを含む、ラベル化h u T F 約12.74ナノグラムを0.4ユニットのグリコペプチダーゼF (1N州、インディアナポリス、ペーリング、マンハイム・バイオケミカル社)、20mMトリス塩酸 (pH7.5)、10mM EDTA、及び1MトリトンX-100を含む20μlの溶液と混合し、37℃に16時間維持した。それから、この脱グリコシル化した産物を、先に述べたSDS-PAGEで分析した。

第7図、レーン4及び5に示した、脱グリコシル化の研究結果は、58kDaのh u T F は、別のタンパク質部分、すなわち軽鎖の存在のため、47kDaのものよりも、高い相対分子量を示すことを表わしている。

このようにして単離したh u T F を、再脂質化し、そのプロコアグラント活性が再構成された。最高の活性を有する再脂質化組

成因子産物を提供するのに必要な組織因子: 脂質比が、0.1% BSAを含むHBSバッファ溶液 (20mMヘプス、pH6.0、140mM NaCl、0.01%アジ化ナトリウム) 中、種々の濃度となるように、上述の得られた単離h u T F を溶かすことにより実験的に測定された。それから、種々h u T F 希釈物を以下に述べるように再脂質化し、さらに、例2で報告されている凝集決定法で測定された、最も高い活性を示す比が、後の使用のために準備された。

h u T F の再脂質化のための脂質は、MO州、セントルイス、シグマケミカル社から入手できるウサギの脳アセトン抽出粉末から抽出することにより調製した。この粉末を、粉末1gに対し、250μlのヘプタン:ブタノール (2:1、v/v) の割合でヘプタン:ブタノールと混合し、ついでこれに含まれる固体を脱脂ガラスシートを用いた濾過により回収した。残留固体について、この抽出を6回くり返した。さらに、この残留固体をロト・エバポレーションで乾燥し、クロロホルムに溶解後、-80℃に保存した。必要なときに、そのクロロホルムに溶解した固体を真空雰囲気下で乾燥し、新しく調製した0.25%のデオキシコール酸ナトリウム溶液中、400μg/mlとなるように溶解し、ウサギ筋リン脂質溶液 (PBPL) を作った。

再脂質化には、各h u T F 希釈物100μlを、100μlのRBPL溶液、0.75μlの1%ウシ血清アルブミンを含むHBS溶液 (HBS/BSA) 及び40μlの100mM塩化ナトリウムと混合する。この混合物を2時間、37℃に維持し、ついで、ここに含まれるh u T F 活性を、例2で述べた凝集決定法で測定した。

5. ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の作成

全てのハイブリドームは、6～8週間の年令の、スクリプス・クリニック・アンド・リサーチ・インスティテュート、動物飼育場から入手できるメスのBalb/cマウス由来の脾臓細胞を用いて作成された。

a. マウスTF8の免疫化

例4で調製した親和性単離化h_uTF.5マイクログラムを100μg/mlとなるよう生理食塩水に溶かし、MO州ハミルトンのリビ・イム/ケム・リサーチ社から入手したR-700アジュバントと1:1の割合で混ぜ、エマルジョン化した。ついで、このエマルジョンをマウスTF8に皮下注射した。

このマウスTF8は同様に、約2週間後、変性h_uTF及びR-700アジュバントを含むエマルジョンの接種を受けた。変性h_uTFは、0.09%トリトンX-100、0.93%SDS、0.2M-2-メルカプトエタノール及び270μg/ml h_uTHを含むTBS (150mM CaCl₂、50mM トリス-HCl (pH 7.5)) を、5分間煮沸して調製した。その後、この変性したh_uTFを、等容量の、0.6μg/ml マウス血清アルブミンを含む生理食塩水と混合した。つづいて、4倍容のアセトンに、この変性h_uTF溶液に混ぜ、生じた混合物を、一晩、-20℃に保った。生じた沈殿を約13000×g、10分間の遠心で集め、4:1 (v/v) のアセトン:水で一度洗浄してから、0.1μg/ml の濃度となるよう、200μgの生理食塩水で懸濁した。

最初の注射から、約4週間後、0.1μgの生理食塩水中33μgの親和性単離化h_uTFを、0.1μgの完全フロイント・アジュバント(cFA)と混合し、エマルジョンを作り、これをマウスTF8に腹腔内注射をした。

最初の接種から8週間後、リン酸緩衝食塩水中15μgの親和

ム・バイオケミカルズ)をイムロン・96穴フレキシブル・ビニルマイクロプレートのウェルに入れた。それからこのプレートを、1時間、37℃で維持し、1μgをウェルの壁に吸着させた。TBSで3回洗浄した後、3%オвалミンを含む100μgのTBS/トリトンを各ウェルに入れ、過剰のタンパク質結合部位をブロックした。

ウェルを、1時間、約20℃に維持したのち、そのブロッキング溶液を、アスピレータで除いた。そして、各ウェルに50μgのハイブリドーム培養上清を加えた。できた固相免疫反応混合物を1時間、37℃に維持した。その後ウェルをTBSで3回洗浄し、過剰の液は、アスピレータで除いた。

例4で調製した、TBS/トリトン中、およそ1μgのh_uTFと、およそ5×10⁵ cpsを含む、50μgの¹²⁵Iラベル化h_uTFを各ウェルに入れ、第2の固相免疫反応混合物を作った。そのウェルをTBS/トリトンで3回洗浄し、固相に結合した¹²⁵I-h_uTF含有免疫反応産物を単離した。過剰の液はアスピレータで除き、ウェルを乾燥させた。個々のウェルを切り離し、各ウェルに含まれる¹²⁵Iを、ガンマカウンタで計数した。

バックグラウンド放射活性(h_uTFと抗体の反応無しの場合)はウェル当たり、平均約200～300 cpsであったが、一方、h_uTFと抗体の反応が有る場合は、ウェル当たり10000 cpsのカウントがある。抗h_uTF抗体の生産が正と決定されたハイブリドームを選択し、本発明のハイブリドームとした。つづいて、これらのハイブリドームを、以下に述べるドット・プロット検定でスクリーニングした。

b. ドット・プロット・イライザ法

例4で調製した、アセトン沈殿したh_uTFを、4:1 (v/v)

性単離化h_uTFを静脈注射(1.μl)し、同じh_uTF/PBS接種を24時間後にも行った。そのマウスTF8の脾臓細胞を融合のため3日後に採取した。

b. マウスTF9の免疫化

マウスTF9は、2回のリビ・アジュバント注射に、エマルジョン化前に変性したh_uTFを用いること以外は、マウスTF8と同じ接種スケジュールがほとんどされた。さらに、第1回目のPBS接種の腹腔内注射をCFA含有接種後4ヶ月半後に行なった。

c. ハイブリドームの作成

TF8及びTF9由来の脾臓細胞に、同じ融合操作を行った。各マウス由来の脾臓細胞約1×10⁶個を、30%ポリエチレングリコール(PEG4000、ATCC 25322-68-3)を含む200μgの融合媒体中、2×10⁵のP3X63Ag.8.653.1ミエローマ細胞と混合した。細胞融合後、生じたハイブリドームを96穴プレートに植殖し、HAT培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン)中で培養し、つづいて、h_uTFと反応する抗体分子生産能でスクリーニングした。

両マウスTF8及びTF9脾臓細胞由来の融合体共、HAT融合媒体耐性ハイブリドーム細胞クローンを生じた。TF8融合体は907個のHAT耐性ハイブリドームを、一方TF9融合体は、348個のHAT耐性ハイブリドームを生じた。

6. 抗h_uTF抗体分子の生産によるハイブリドームのスクリーニング

a. 固相RIA

TBS中、20μg/mlに希釈した100μgのヤギ抗マウスIgG (IN州、インデアナポリス、ペーリンガー・マンハイ

のアセトン:水溶液で抽出した。残存する沈殿をTBS中に20μg/mlとなるように懸濁した。このh_uTF溶液20μg (1μl)を、消えないインクで、BA83ニトロセルロース紙(シュレイチャー・アンド・シュエル、NH州、キーン)上に書いた数字の隣にスポットする。スポットしたh_uTFを空気乾燥し、個々のスポットをパンチを用いて、ディスクに切り出す。個々のディスクを、BLOTT (ジョンソン(Johnson)等、ジェネティック・アナリティカル・テクニク (Gene, Anal. Tech.) 1巻、3頁(1984年))を含む、多穴トレイの個々のウェルに差し、約1時間、37℃に維持した。

このBLOTTを、ウェルからアスピレータで除き、各ウェルに、200μgのハイブリドーム培養上清を加えた。さらにこのウェルを2時間、37℃に保ち、その後、このペーパーディスクを、TBSで2回洗浄し、ウェルから取り出し、TBSにより、さらに洗浄するため、1つの大きな容器に入れた。ついで、過剰の液体をその容器から除去する。

プロトプロット試薬キットの(MI州、アン・アーバー、プロメガバイオテック社)アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgGを、BLOTTで5700倍に希釈し、このペーパーディスクと接触させた。このプロトプロット溶液との接触を、37℃で30分間保った。その後、ペーパーディスクを、TBS中で3回洗浄した。業者の指示に従い、プロトプロットキット中に含まれている発色物質により、ディスク上に結合したアルカリホスファターゼが検出される。

c. ウェスタン・プロット検定法

ウェスタン・プロット検定のため、例4で報告したように単離した約10μgのh_uTFをサンプルバッファ(2% SDS、

5.0 mMジチオスレイトール、1.0%グリセリン)に溶かし、5分間、煮沸した。それから、これを、レムリ (Lammli)により報告された(ネイチャー (Nature)、226巻、680頁(1970年))、参考としてここに述べられている、予め染色された分子量標準の小さい両側のレーンの間の広いレーンに試料をロードする、分取型のスラブゲルを用いたSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた(分子量標準:MA州、ニュートンセンター、ディバークファアード・バイオテック社)。参考としてここに述べられている、トウビン(Towbin)等(プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、76巻、4350頁(1979))により報告されているように、電気泳動及びニトロセルロースへの電気ブロッティング後、このプロットを、TBS中の5%脱脂粉乳溶液でブロックし、マニホルドに固定した(MA州、ケンブリッジ、イムネテクス社、ミニブロック)。8個のハイブリドーマ細胞培養上清のストロークを、各マニホルドスロットにロードし、37℃で1時間インキュベートした後、このプロットを取り除き、TBSで洗浄した(0.02%アジ化ナトリウム含有TBS)。抗体が結合したレーンを、発色物質で発色させたアルカリホスファターゼを結合した第2抗体を用い、供給業者の推める方法に従って可視化した(W1州、マジソン、プロメガバイオテック、プロトプロット)。陽性のストローク由来の培養上清を、5%脱脂粉乳TBSによる8倍希釈物について、別個に再テストし、抗TF抗体を生産する個々のハイブリドーマクローンの同定を行った。

抗hуTF抗体産生が正と判断されたハイブリドーマをさらに特徴づけるために選択した。例えば、上記のTF8融合体由来のハイブリドーマは、例6bで述べられているドット・プロット検

5G9モノクローナル抗体10μgの透析により、活性化した。活性化したTF8-5G9を、2μgのアフィゲル-10アガロースビーズ(バイオラフ)と混合し、できたカップリング反応混合物を、製造業者の指示に従い処理して、TF8-5G9/アガロース固体サポートを作った。

それから、例3で報告したように、固体サポート上の過剰のタンパク質結合部位をブロックし、洗浄後、減圧濾過して、TF8-5G9/アガロースケーキを作った。

9. hуTFの免疫親和性による単離

ヒトの胎のおよそ半分、すなわち約100μgに等しい、例1で調製した胎抽出液を、計6μgのパプファAに対し、2回の外液交換をしつつ、4℃で3日間透析した。その透析した抽出物を1.5時間、10,000×gで遠心した。できた上清を、例4で調製したグリシンエチルエステル-アガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら、2時間室温に維持したのち、その固相と液相を焼結ガラスロートによる濾過で分離した。そのhуTF含有液相を回収し、例8で調製したTF8-5G9/アガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作った。

この免疫反応混合物を、回転しながら一晩、4℃に保ち、凝縮因子含有固相免疫反応物を形成させた。それから、この固相及び液相を先に述べたように濾過で分離した。固相を残置し、これを10倍容のパプファAで洗浄した。その後、固相をガラスクロマトグラフィーカラムに移し、順次、0.1%トリトンX-100を含む2倍容の1M NaCl、及び0.1%トリトンX-100を含む2倍容の0.1Mグリシン(pH4.0)で洗った。

上述の洗浄後、その固体サポートに免疫学的に結合しているhуTF、その固体サポートを、焼結ガラスロート上に保持した

定値及び例6cで述べられているウェスタンブロット検定法でhуTFとの免疫反応を、そのハイブリドーマ培養上清が示すならば、抗hуTF抗体産生ハイブリドーマ培養と特徴づけられる。これらの特徴は、24個のTF9ハイブリドーマ細胞系列についてみられ、そのほとんどは、例13の第5表に示した。その他のスクリーニング法で選択したハイブリドーマにより産生される抗体分子は胎細胞を独自の融合体に提供する免疫化マウス(すなわちTF8又はTF9)、及び、独特のHAT増殖耐性ハイブリドーマ細胞が単離される、96穴培養プレート、列番号及びウェル番号を示す文字によって呼ばれる(すなわち、5B7、11D12、その他)。特殊な意味の文字は、1語、ハイフン線又は2語として、ここにリストされる。例えば次の文字は同じモノクローナル抗体分子組成を意味している:TF8-5G9、TF8-5G9及びTF8-5G9。

7. イムノグロブリンIgGの単離

イムノグロブリンIgGは、製造業者の指示に従い、バイオラフボラトリーズMAPS IIシステムを用い、マウスのハイブリドーマ細胞系列TF8-5G9(ATCC第HB9382号)を含むマウスの腹水液から単離される。単離したIgGのタンパク質濃度は、製造業者の説明書に従い、BCAタンパク質検定試薬(ピアスケミカル社)を用いて測定した。

8. hуTFの免疫親和性による単離のための、抗hуTF含有固体サポートの調製

抗hуTF抗体を、アガロース固体マトリックスへカップリングするため、少なくとも1回透析液交換を行う、0.1M MES、pH6.5を含む500μgの透析バッファに対する、4℃、16時間の、例7で報告したように調製した、MAPS単離TF8-

まま、0.1Mグリシン、pH2.5及び1%トリトンX-100溶液20μgで洗浄することにより、開放(溶出)した。それから、例4に全て述べたように、溶出物質を回収し、hуTF検定を行ない、集めて透析した。

透析物を4倍容の冷アセトンと混合し、hуTFタンパク質を沈殿化した。さらにこの沈殿をおよそ-10℃、5,000×g、30分の遠心で集めた。生成したペレットを室温雰囲気下で乾燥し、そのペレットの一部を酸性条件下のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した(SDS-PAGE)。

第8図に示したこの分析結果は、hуTFが免疫親和性により、脱脂粉乳1グラム当たり、33μgのhуTFの収率で単離されることを示している。

10. 抗hуTF抗体による凝集の阻害

10μgのハイブリドーマ培養上清を、例4で調製した約2μgの高純度hуTFを含む90μgのHBS/BSAと混合した。このようにして作った免疫反応混合物を30分間37℃に保ち、抗hуTF抗体分子を免疫学的にhуTFに結合させ、免疫反応物を形成させた。つづいて、この免疫反応混合物について、例2で述べたように、hуTFのプロコアグラント活性を検定した。ネガティブ・コントロールとして、無関係のIgG調製物を抗hуTF抗体の代りに用いた。

効果的hуTF濃度は、インヒビターの存在下測定した凝集時間を用い、例2のように作った標準曲線から外挿した。阻害は、用いた実際のhуTF濃度について、効果的hуTF濃度の比率として表わされる。少なくとも50パーセントの阻害をするモノクローナル抗体分子調製物は、本発明の抗体分子成分を中和するものとして選択された。

例5に述べたように、単離したh u T Fに対して生じたハイブリドーマ由来の数多い培養上清を、凝集開始を阻害する能力について、先の操作により測定した。有意に凝集を阻害することが分ったハイブリドーマを、第5表に示した。

また、抗h u T F抗体による凝集阻害は、予め形成されたh u T F-因子Ⅷ複合体を用いて行った。例4で調製した再脂質化したh u T F 10 μ gを含む10 μ gを、HBS/BSA 10 μ g、20 μ M塩化カルシウム10 μ g及び、例3で述べられているように調製した因子Ⅷ25 μ gを含む10 μ gと混合する。この混合物を15分間37℃に保ち、h u T Fを、混合物として使える因子Ⅷと複合体をつくらせる。その後、10 μ gの溶液に、例1で述べたように調製したMAPS-単離化モノクローナル抗体約10 μ gを混合し、この第2の混合物を、30分間37℃に保った。さらに、第1に20 μ M塩化カルシウム100 μ gについて、ヒトのクエン酸化血漿又は例12で述べてように調製した因子Ⅷ欠損血漿を加え、ついで秒で表わされた凝集時間を観測することにより、生成した混合物の凝集阻害の測定を行った。例10で述べられているように、阻害率を表わし、予め形成したh u T F-因子Ⅷ複合体での阻害の結果を、第6表に示した。

第5表

抗h u T Fによるh u T F-因子Ⅷ依存の凝集阻害

1. クエン酸化ヒト血漿による凝集

| 抗 体 | 因子Ⅷ ^a | 阻 害 率 |
|--------------------------|------------------|-------|
| ブランク ^a | + | 0 |
| T F 8 5 G 9 ^b | + | 58% |
| コントロール ^a | + | 0 |
| T F 8 5 G 9 | - | 83% |

複合体により開始する凝集を阻害する能力を有意にもつと考えた。これらのM α A β には、T F 9-1 B 8、T F 9-5 B 1、T F 8-5 C 4、T F 8-11 D 12、及びT F 8-21 F 2がある。

1.1. ポリペプチド合成

ここで使用されている種々のh u T F h領域に対応するポリペプチドをヘゲンマイヤー(Heggenmayer)等(Bopp-Seiler's)(Hoppe-Seiler's)Z. フィジオロジカル・ケミストリー、353巻、1973頁(1982年)のシンメトリカル・アンハイドライド法を用いたアブライド・バイオシステムズモデル430Aペプチド合成機で化学合成した。第1及び第2表のポリペプチドに加え、以下に示す第3表のポリペプチドも合成し、これには、h u T F hと反応できる抗ポリペプチド抗体の生産に有用な、本発明のポリペプチドが含まれている。

第3表

抗原性ポリペプチド

1.2. ポリペプチドによる凝集阻害

h u T F依存の凝集開始を疎開する、本発明のポリペプチドの能力を、まず、このポリペプチドを因子Ⅷ/Ⅷ α 及びカルシウムイオン存在下でインキュベーションし、さらにこの混合物を、因子Ⅷ/Ⅷ α 欠損血漿に加えて、凝集時間を見積った。

ヒトの因子Ⅷ/Ⅷ α を例3に述べた方法で単離した。HBS/BSA α β と、この単離した因子Ⅷ/Ⅷ α 200 μ gの溶液10 μ gに、100 μ g HBS、20 μ g 25 μ M C a C l α 、及び100

コントロール

0

B. 因子Ⅷテブリート化ヒト血漿

| 抗 体 | 因子Ⅷ | 阻 害 率 |
|-------------|-----|-------|
| ブランク | + | 0 |
| T F 8 5 G 9 | + | 58% |
| コントロール | + | 0 |

a. "ブランク"とは、モノクローナル抗体を検定法で用いなかったことを示している。

b. "T F 8 5 G 9"とは、ハイブリドーマT F 8-5 G 9から単離したモノクローナル抗体を検定で用いたことを示している。

c. "コントロール"とは、検定で無関係なモノクローナル抗体を用いたことを示している。

d. "+"は、抗体を混合物に加える前、因子Ⅷを加え、特異したh u T Fと複合体を形成させることを示す。

抗h u T F抗体による凝集阻害の別の研究が、T Fを因子Ⅷ/Ⅷ α と混合させ、T F:因子Ⅷ/Ⅷ α 複合体を形成させる前後の阻害を比較する条件下で行った。

これらの研究で、予め形成したT F:Ⅷ/Ⅷ α 複合体を用いた抗h u T F h抗体による凝集阻害を、利用するモノクローナル抗体含有溶液10 μ gにMAPS単離化モノクローナル抗体含有溶液の代わりに、ハイブリドーマ培養上清を用いた以外、例10で述べたのと基本的に同様に行った。比較のため、抗h u T F抗体による凝集阻害を、例10で述べたように、因子Ⅷ/Ⅷ α を含むクエン酸化血漿との混合の前、それら抗体及び再脂質化h u T Fの免疫複合体を形成することにより検定した。

ここで述べている全ての抗体は、この比較阻害検定試験を行ったが、約60%以上の阻害を示すものだけが、h u T F:Ⅷ/Ⅷ α

μ gの合成ポリペプチド含有TBS/トリトンを加えた。種々の濃度で含まれる多種の混合物をこのように調製し、それを、15分間、37℃に維持した。例4で述べたように調製した再脂質化した組織因子を、HBS/BSAで希釈し、例2で述べたような凝集検定法でテストしたとき、10 μ gでおよそ45秒の凝集時間が得られるように調製した。上記のように維持した混合物をさらに、再脂質化h u T F 10 μ g希釈物、25 μ M C a C l α 、100 μ g及び1容の血漿に対し1.5容のHBSで希釈した因子Ⅷ/Ⅷ α 欠損血漿100 μ g(KA州、オーバーランド・パーク、ジョージ・キング・バイオメティカル社)と混合した。凝集時間の延長は、この合成ポリペプチドによる凝集の阻害を示していることになる。阻害率を、例10で述べているように計算した。少なくとも30%の凝集阻害を示すポリペプチドはh u T F h結合部位ポリペプチド類似物、すなわち、第4表のセクション1で示されているポリペプチド、p 26-49、p 146-107及びp 161-189である。

別に、上記阻害検定において、モノクローナル抗体による免疫親和性吸着により、因子Ⅷ/Ⅷ α 欠損血漿である因子Ⅷ/Ⅷ α 欠損血漿を用いた。ヒトの因子Ⅷ/Ⅷ α に対するモノクローナル抗体を、例3で述べたように単離した因子Ⅷ/Ⅷ α をh u T Fの代わりに免疫原として用いた以外、例5で述べたものと基本的に同様に調製した。できたハイブリドーマを、イライザ法で評価し、1 N州、サウスベンド、エンザイム・リサーチ・ラボラトリーズ社から入手できるヒトの血液タンパク質、タンパク質S、因子IX、因子X及び因子IIと反応しないハイブリドーマを同定した。そのようなハイブリドーマ、F V 11、F 1、2 H 3-3.2は、J.S. エジントン(J. Edgington)博士から取いた(CA州、ラジララ

特表平1-503438 (22)

スクリアス・クリニク・アンド・リサーチ・ファンデーション社)。イムノグロブリンIgGを、ハイブリドマFV11、F1、2H3-3.2を含むマウスの腹水から単離し、この単離したIgGを、例8に述べたように、固体サポートに結合させた。できた抗因子Ⅴ/V₈モノクローナル抗体含有固体サポートを貯留した正常なクエン酸化血漿から、血漿含有液相を収縮し、保留すること以外、例9で述べた免疫親和性操作を用いて、因子Ⅴ/V₈を除くのに用いた。

脂質化型で用いたとき、競合的に凝集を阻害する、いくつかのポリペプチドの能力を、100μMの合成ポリペプチド溶液の代りに、100μMの脂質化合成ポリペプチドを用いることにより上記検定法での評価を行った。

脂質化合成ポリペプチドは、合成ポリペプチドを、単離したh₈TFの代りに用いること以外、単離したh₈TFの再脂質化で用いた、例4で述べた方法で調製した。ルーチンには脂質とポリペプチドの比は52:1 (w/w) が用いられた。少なくとも30%の凝集阻害を起こす脂質化ポリペプチドが、脂質化型で存在するとき、h₈TF結合部位ポリペプチド類似物すなわち、第4表のセクションIで示されたポリペプチドと考えた。

第4表

h₈TFhのポリペプチド類似物の
h₈TFによる凝集開始の阻害

| ポリペプチド | 濃度 | 阻害 |
|-----------------|------|-------|
| I. 非リン脂質化ポリペプチド | | |
| p1-30 | 25.0 | 100μM |
| p26-49 | 88.8 | 100μM |
| p41-71 | 25.0 | 100μM |

た。

50μMのハイブリドマ培養上清を各ウェルに入れ、1時間37℃に維持した。さらにこのウェルをTBSで3回洗浄し、過剰の液体をアスピレートで除いた。

単離化h₈TFは、例9で述べたように、免疫親和性カラムで調製した。単離化h₈TFを含むアセトン沈殿をTBS/トリトンに溶かし、そのタンパク質濃度を、製造業者の説明書に従がい、BCAタンパク質検定試薬（ピラス）を用いて測定した。h₈TFの炭化水素側鎖を、オシヤネシー（O'shaunessy）等の報告した方法（イムノロジカル・レターズ（Immunol. Letters）、8巻、273～277頁（1984年））に従がい、ビオチン-ヒドラジド（NY州、ブレインビュー、ICNバイオメディカル社）を用いて、ビオチン化し、ビオチン化h₈TF溶液を作った。

TBS/トリトン中500μg/mLに調製した50μMのビオチン化h₈TF溶液を、5μM合成ポリペプチドとともに、各ウェルに入れ、1時間、37℃に維持した。その後、このウェルをTBS/トリトンで3回洗浄した。

5mM EDTA、0.5%トリトンX-100及び1%BSAを含むTBSで1/100に希釈した、100μMのストレプトアビジン-結合アルカリホスファターゼ（NY州、ニューヨーク、エンゾバイオケム社、デテク1-spk）を各ウェルに入れ、30分間、37℃に維持した。その後、このウェルを、10mMリン酸カリウム（pH6.5）、2%BSA、0.5%トリトンX-100、0.5M塩化ナトリウム及び1mM EDTAを含む溶液を4回洗い、ついで検出バッファ（0.1Mトリス・塩酸（pH8.8）、0.1M NaCl、5mM MgCl₂）で1度洗った。

その後、検出バッファ中、2mMのp-ニトロフェニルリン酸

| | | |
|----------|------|-------|
| p40-49 | 25.0 | 100μM |
| p56-71 | 25.0 | 100μM |
| p72-104 | 25.0 | 100μM |
| p94-123 | 20.0 | 100μM |
| p121-155 | 10.0 | 100μM |
| p146-167 | 87.5 | 100μM |
| p161-189 | 32.5 | 100μM |
| p190-209 | 20.0 | 100μM |
| p204-226 | 20.0 | 100μM |
| なし | 0 | - |

II. リン脂質化ポリペプチド

| | | |
|----------|------|-------|
| p1-30 | 81.0 | 100μM |
| p26-40 | 83.0 | 100μM |
| p40-71 | 65.0 | 100μM |
| p50-71 | 73.3 | 300μM |
| p94-123 | 93.7 | 100μM |
| p121-155 | 55.0 | 100μM |
| p146-167 | 80.0 | 100μM |
| p161-189 | 94.0 | 100μM |

※、例12で述べたように測定した阻害率

上記のポリペプチド阻害研究で得られた代表的阻害率-応答曲線を第9及び第10図に示した。

13. ポリペプチドによる抗体-h₈TF免疫反応の阻害

フレキシブルビニルでできたイムロンU底96穴プレート（ダイナテック社）のウェルを過剰タンパク質結合部位のブロッキングを、37℃20分間行うこと以外、例6で述べた方法でヤギ抗マウスIgG（ペーリンガー・マンハイム社）によりコーティングし

を含む溶液100μLを各ウェルに加え、1時間37℃に維持する。ついで、405ナノメーターでの光学密度を各ウェルについて、バイオ・テック・マイクロプレートリーダー（VT州、ウィノースキ、バイオ・テック・インスツルメント）を用いて測定した。

この競合的阻害研究の結果を第5表に示した。

第5表

モノクローナル抗体とポリペプチドの相互作用の表

| Mad* | p1 | p26 | p40 | p41 | p56 | p72 | p94 | p121 | p146 | p161 | p190 |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
| | -30 | -49 | -71 | -49 | -71 | -104 | -123 | -155 | -167 | -189 | -209 |
| TF85G9 | + | | | | | | | | | | |
| TF811D12 | + | | | | | | | | | | |
| TF85C4 | | | | | | | | | | | |
| TF821P2 | | | | | | | | | | | |
| TF91D5 | | + | | | + | | | | | | |
| TF92C4 | | + | + | | + | | | | | | |
| TF92F6 | | | | | | | + | | | | |
| TF95C7 | | + | + | | + | | | | | | |
| TF96B4 | | | | | | | | | | | |
| TF99C3 | | + | + | | + | | | | | | |
| TF910C2 | | | | | | | | | | | |
| TF81F1 | + | | | | | | | | | | |
| TF91E7 | | | | | | + | | | | + | + |
| TF91B8 | | | | | | | | | | | |
| TF91B9 | + | | | | | | | | | | |
| TF94D11 | + | + | | | + | | | | | | |
| TF95G4 | + | | | | | | | | | | |
| TF95M7 | + | + | | | | | | | | | |
| TF96G4 | + | | | | | | | | | | |

| | | | |
|-----------|---|---|---|
| TF97E10 | + | | |
| TF98E8 | + | + | |
| TF99E1 | + | + | + |
| TF99B4 | + | + | |
| TF96CB* | + | + | + |
| TF910H5* | + | | + |
| TF99D5* | + | | + |
| TF910H10* | + | + | + |

a. 各モノクローナル抗体 (hob) は、同名のハイブリドーマにより産生された。全てのハイブリドーマは例13で述べたように、ハイブリドーマ培養物上清を用いてスクリーニングした。

b. これらの抗体は、例10の結果から中和性をもたないと考えた。その他の全ての抗体は、同結果に従がい中和性をもつと考えた。

もし、ポリペプチド存在下で得られた吸光度測定値が、ポリペプチド非存在下で与えられた抗体に対して得られた平均値値から1以上の標準偏差をもつとき、図表が有意に起ったと考えた。

14. 2部位イライザ法による身体サンプルにおけるhobTF検出

血液、血漿、唾液、尿、その他の身体サンプル中のhobTFは、同じhobTF分子に同時に結合することができる2つのモノクローナル抗体を用いて検出できる。

イムロン・ポリスチレンU底96穴プレートに、まず、各ウェルに、TBS中100μg/mlに希釈した1:G100μg/mlを入れ、ついで、ウェルと、1:G溶液との接触を、4℃、一晩維持することにより、ヤギ抗マウス1:G (ペーリンガー・マンハイム社) でコートした。そのウェルを、TBSで3回洗浄し、ついで、

各ウェルに、3%BSAを含むTBS/トリトン100μg/mlを加えた。その後、これらのウェルを1時間、37℃に維持してから、TBSで3回洗浄し、さらに、過剰の液体をアスピレータで除いた。

第1のハイブリドーマ、TF9-6B4由来の抗hobTF抗体分子含有培養上清100μg/mlを各ウェルに入れ、1時間37℃に維持した。それから、これらのウェルをTBSで3回洗浄し、ついで過剰の液体を、アスピレータで除いた。

例9で説明したように、免疫親和性単離し、アセトン沈殿化hobTFを、TBS/トリトンに溶した。このhobTF溶液の希釈物をTBS/トリトンで5μg/mlから0.5μg/mlの範囲で調整し、希釈液100μg/mlをイムロンプレートのウェルに入れた。このhobTF希釈液を、第1の抗体と接触させ、1時間37℃に維持した。さらにこの希釈物をウェルから除去、ウェルをTBS/トリトンで3回洗浄した。過剰の液体をアスピレータで除いた。

抗hobTF抗体を、例7で述べた方法により、第2のハイブリドーマTF9-10H10の腹水からMAPSで単離した。この抗体溶液のタンパク質を測定し、ついで、例13で述べたようにビオチン化によりラベル化した。

このビオチン化した抗hobTF抗体をTBS/トリトンで600μg/mlに希釈し、この溶液100μg/mlを各ウェルに入れた。そのウェルを1時間、37℃に維持し、ついでTBS/トリトンで3回洗った。

この結合した、ビオチン化抗hobTF抗体を、例13で述べたデテクト-alkシステムを用いて検出した。この検定法で第1及び第2の抗体として用いているモノクローナル抗体は、その2つ

がhobTFと同時に結合できる能力をもつ限り、いろいろ試みることができる。例えば、第1抗体として、TF9-6B4を用いたとき、TF9-11D12を、TF9-10H10の代りに、第2の抗体として用いることができる。このように、本発明は、本検定法で同時に結合できる種々の抗体の組合せを考案した。

15. 全プレhobTFコード配列を含むDNA断片の構築

全プレhobTFコード配列を含むDNA断片を第11図にその制限地図に示されている、組換えプラスミドpCTF64、pCTF403及びpCTF314と、この分野でよく知られている操作を用いて構築することができる。例えば、マニアチス(Maniatis)等、NY州、コーールドスプリングハーバー、モレキュラー・ラボラトリー、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クロニング(1983年)参照。

第11図に示されている組換えDNAプラスミド中に含まれる挿入断片は、クローニングを可能にする、各末端のEcoRIリンカー-5'-GGCAATTC-3' (MA州、レキシントン、コラボラチブリサーチ社) を有している。これらのリンカー配列は、天然のhobTFh DNAコード配列の一部ではないので、第2図に示されるスクレオチド配列中には存在しない。組換えDNA分子構築の説明は、図表するhobTFh DNA配列についても明らかにように、EcoRI末端を含む消化により生じ、これらの付加的なリンカー配列を含む断片は、第2図で示したスクレオチド塩基番号によって示されるだろう。この断片は、その末端にこれら付加的配列を含むことが理解できよう。

プラスミドpCTF64を、制限エンドスクレアーゼEcoRI及びDraIIIで消化し、第2図で示される、塩基番号1~296番に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。このよ

うにして作った、302スクレオチド塩基対(bp)断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画により単離し、アルカリホスファターゼを用いた処理により脱リン酸化した。

プラスミドpCTF403を制限エンドスクレアーゼEcoRIで消化し、第2図の残基776~1125番に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。生成した352bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分画により単離した。

プラスミドpCTF314を、制限エンドスクレアーゼEcoRIで消化し、生成した647bpの断片をサイズ分画で単離した。この断片は、第2図の残基135~775番の配列に対応するスクレオチド配列を含んでいる。647bp断片をサイズ分画で単離し、アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。

この352bp断片及び脱リン酸化した647bp断片をT4DNAリガーゼの反応によって機能的に結合(ライゲーション)し、第2図の残基135~1125番に対応するスクレオチド配列を有する999bpの断片を作った。

さらに、この999bp断片を、制限エンドスクレアーゼDraIIIで消化し、第2図の残基296と297番の間でこの999bp断片を切断し、これによって、158bpと831bpの断片が生ずる。さらに脱リン酸化した302bpの断片と、831bpの断片をT4DNAリガーゼで機能的に結合し、第2図の1~1125番に対応するスクレオチド配列を含む1125bp断片を作った。

EcoRIで消化して、クローニングプラスミドベクターpUC8を線状にした。先に調製した1133bp断片と、EcoRI消化したベクターをT4DNAリガーゼで機能的に結合して環状組換えDNA分子pUC-プレhobTFhを作った。

大腸菌RR1株(MD州、ゲイザーズバーグ、ベセスダ・リサ

一ナラボラトリーズ)をpUC-ブレハUTFhでトランスホームし、そしてアンピシリン耐性に基づいて、トランスホーマントを選択した。それから、この選択したトランスホーマントをクローニングし、ブレハUTFh構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によりスクリーニングした。

ブレハUTFh構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によるスクリーニングは、各選択されたトランスホーマント由来のrDNAをEcoRIで消化することによって行った。生じたEcoRI断片をアガロースゲルでサイズに従って分解した。352bp、781bp及び2682bpのDNA断片に対応する三つのバンドパターンを示す組換えDNA分子でブレハUTFh構造遺伝子の存在を確認した。上述のEcoRI消化パターンを生ずるrDNAを有する大腸菌RR1トランスホーマントは、本発明の組換えDNA分子を含み、かつ、選択され(回収)された。

細胞外アンカー領域を含むが、カルボキシル末端にトランスノンブレン・アンカー領域を欠く、ブレハUTFhコード配列の実質的領域を含み、従って、可溶性ハUTFhタンパク質をコードするDNA断片を次のように構築した。

プラスミドpCTF314を制限エンドヌクレアーゼEcoRIで消化し、第2図の1~486番の残基に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。このようにしてきた486bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し、その後、アルカリホスファターゼ処理で脱リン酸化した。つぎに、このように脱リン酸化した486bpの断片を制限エンドヌクレアーゼDraIIを用いて消化し、第2図の296番と297番の間の部位で、486bp断片を切断し、296bp及び190bpの断片とした。この296bpの断片をアガロースゲルのサイズ分画で単離した。

(1983年)の方法に従い、互いにオリゴヌクレオチドが機能的に結合するのを防ぐため、ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化を行なわれなかったこと以外は同様にして、

5'-AATTTCAGAGAAATAGCAATTCGGG-3'

3'-ATCTCTTATTCCTTAAGCCG-5'

の配列をもつ、合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作った。このオリゴヌクレオチドをアニールし、粘着EcoRI末端を含む二本鎖DNAリンカー断片を作り、ローザスタイン(Rothstein)の方法(メソッズ・イン・エンザイモロジー(Bothstein in Enzymol.), 58巻, 98頁(1979年))に従って、平滑末端とした。つぎに、このリンカー断片を、pUC-ブレハUTFh-Tから得た775bp断片に機能的に結合し、775bp断片の各末端に1つのアニール断片を含む817bp断片を作った。その後、この817bp断片をEcoRIで消化し、817bp断片の各末端を平滑からEcoRI粘着末端へと転換し、805bp断片とした。この805bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単離した。

クローニングプラスミドベクターpUC18をEcoRIで消化し線状化した。先に調製した805bp断片とEcoRI消化したベクターをT4DNAリガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換えDNA分子pUC-ブレハUTFh-TRとした。

大腸菌RR1をpUC-ブレハUTFh-TRでトランスホームし、pUC-ブレハUTFh-TRを含むクローンである、アンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

16. 組換えハUTFhコード配列の発現に反ハUTFhの生産
組換えDNA分子由来の組換えハUTFhの発現は原核性細菌細胞、非芽生真核性細胞及びより高等な(脊椎)真核性細胞を含

プラスミドpCTF314を制限エンドヌクレアーゼEcoRIで消化し、第2図の135~775番の残基に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。この641bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し、ついで、アルカリホスファターゼ処理により脱リン酸化した。この脱リン酸化した641bp断片を、DraIIで消化し、第2図の296番及び297番の間の部位で、この641bp断片を切断し、これにより、162bp及び479bpの断片とした。このうち、479bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画により単離した。

上述のように調製した296bp及び479bpの断片を、T4DNAリガーゼを用いた反応により機能的に結合(ライゲーション)し、第2図の1番から775番の配列に対応するスクレオチドアダプター配列を有する775bp断片を作った。

クローニングプラスミドベクターpUC18をEcoRIによる消化で線状化する。上記のように調製した775bp断片と、EcoRI消化ベクターをT4DNAリガーゼで機能的に結合し、環状組換えDNA分子pUC-ブレハUTFh-Tを作った。

大腸菌RR1を、pUC-ブレハUTFh-Tでトランスホームし、pUC-ブレハUTFh-Tを含むクローンであるアンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

組換えDNA分子pUC-ブレハUTFh-TをEcoRIで消化し、生成した775bp断片をサイズ分画で単離した。

カルーダース(Carothers)等(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー(J. Am. Chem. Soc.), 103巻, 3185頁(1981年))及びゲイト(Gait)等(コールドスプリング・ハーバー・シンポジウム・クオント・バイオロジー(Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.)47巻, 393

各種々の発現媒体中で行うことができる。そのような発現媒体の代表例には、各々、大腸菌S. セレビシアエ(cerevisiae)及びチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞がある。

a. 大腸菌におけるブレハUTFhの発現

大腸菌において、ブレハUTFh構造遺伝子を発現できる組換えDNA分子は、例15で作ったpUC-ブレハUTFh組換えDNA分子由来のブレハUTFh遺伝子含有DNA断片を単離し、ついで、この断片を原核性発現ベクターに機能的に結合することにより構築することができる。

組換えDNA分子pUC-ブレハUTFhを、そのプラスミド中に存在するEcoRI部位を部分的に切断するような条件で、EcoRI消化する。この部分消化法は、ニアチス(Neatias)等、NY州、コールドスプリング・ハーバー、コールドスプリングハーバー・ラボラトリーズ、ラボラトリ・マニピュレーション・クロウニングにより詳細に報告されている。図2の残基1番から、1125番で示される配列に対応するスクレオチド配列を含む1133bp断片を、サイズ分画によりEcoRI部分分解産物から単離した。

原核性発現ベクターpKK223-3(NJ州、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社)を、EcoRIによる消化で線状化した。この消化ベクター及び1133bpブレハUTFh構造遺伝子含有断片をT4DNAリガーゼを用いて機能的に結合し、環状組換えDNA分子pKK-ブレハUTFhを作った。

大腸菌RR1をpKK-ブレハUTFhでトランスホームし、pKK-ブレハUTFh含有クローンとしてアンピシリン耐性トランスホーマントを選択した。

b. 大腸菌におけるh u T F hの発現

大腸菌においてh u T F h遺伝子を発現することができる組換えDNA分子は、例16aで調製した1133bp断片を操作して構築した。まずこの断片をアルカリホスファターゼで脱リン酸化し、ついで、制限エンドヌクレアーゼBbvIで消化した。生じた964bpの断片は、第2図の残基164~1125番に対応するヌクレオチド配列を含んでおり、サイズ分画により分離した。

先に述べたように、

及び

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作り、ロザースタイン (Rothstein) 等 (メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.) 68巻、98頁 (1979年)) の方法に従って、粘着EcoRI及びBbvI末端を含む二本鎖DNAリンカー断片をアニーリングすることにより作った。このリンカーをまず964bp断片に機能的に結合して、1008bp断片とした。ついで、1008bp断片を、T4DNAリガーゼを用い、EcoRI消化したベクターpKK223-3と機能的に結合し、環状組換えDNA分子pKK-h u T F hを作った。

組換えDNA分子pKK-h u T F hは、pKK-プレh u T F hと、①残基1~129番の残基がない、及び②新しいメチオニンコドンが、残基130番の前に機能的に結合しており、その結果タンパク質発現 (翻訳) が挿入されたメチオニンコドンの場所ではまることだけが異なる。

組換えDNA分子pKK-プレh u T F h及びpKK-h u T F hを、その中に含まれる構造遺伝子によりコードされるh u T F h

を、内在于する構造遺伝子によりコードされるh u T F h又はプレh u T F hタンパク質の発現するのに適合した真核性宿主細胞中に導入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、CHO細胞がある。

d. CHO細胞におけるh u T F hの発現

哺乳類細胞において、h u T F hを発現することができる組換えDNA分子を、例16c由来のpSV-プレh u T F hを、制限エンドヌクレアーゼBglIIで消化することにより構築した。生成した1153bp断片をサイズ分画で分離し、ついで、制限エンドヌクレアーゼBbvIで消化した。生じた974bp断片は、図2の残基164~1125番の配列に対応するヌクレオチドアダプター配列を含み、これを、サイズ分画により分離した。

先に述べた方法で、

及び

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を合成し、アニーリングして、粘着性BglII及びBbvI末端を含む二本鎖DNAリンカー断片を作った。ついで、このリンカーをT4DNAリガーゼを用いて974bp断片に機能的に結合して、第2図の残基130~1125番の残基の配列に対応するヌクレオチド配列を含む、1018bp断片を作った。

プラスミド発現ベクターpKSV-10を、BglIIで消化して線状とし、ついで、T4DNAリガーゼを用いて、1018bp断片に機能的に結合し、環状組換えDNA分子pSV-h u T F hを作った。

組換えDNA分子pSV-プレh u T F h及びpSV-h u T F h

又はプレh u T F hの発現に適合する真核性宿主細胞中に導入した。そのような宿主細胞の代表例は、大腸菌RR1株である。この宿主を、組換えDNA分子でトランスホームし、細胞増殖とこの組換えDNAの発現に適合する条件下で培養し、この発現したタンパク質を従来の技術を用いて収獲した。

c. CHO細胞におけるプレh u T F hの発現

脊椎動物細胞中、プレh u T F h遺伝子を発現できる組換えDNA分子を例16aで調製した1133bp断片を用いて構築した。

カルーザス (Caruthers) 等及びゲイト (Gait) 等の方法 (上記) を用い、

5'-AATTCCTCCGGG-3'

5'-GATCCCCCGG-3'

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作った。ついでこのオリゴヌクレオチドアダプター断片を、ロザースタイン (Rothstein) 等の方法 (メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.) 68巻、98頁 (1979年)) を用い、1133bp断片の各末端に結合し、元々1133bp断片に存在するEcoRI粘着末端を、BglII粘着末端に転換した。

真核性シミアンウイルス (SV40) を基本とする発現ベクター、pKSV-10 (NJ、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) を、制限エンドヌクレアーゼBglIIによる消化で線状化した。1133bpのBglII適合断片及び、BglII消化ベクターを、T4DNAリガーゼを用いて、機能的に結合し、環状組換えDNA分子pSV-プレh u T F hを作った。

大腸菌RR1を、pSV-プレh u T F hでトランスホームし、アンピシリン耐性のトランスフォーマントを選択し、クローン化し

を、内在于する構造遺伝子によりコードされるh u T F h又はプレh u T F hタンパク質の発現するのに適合した真核性宿主細胞中に導入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、CHO細胞がある。

宿主を、組換えDNA分子でトランスフェクトし、安定なトランスフォーマントを従来法で選択した。例えば、グラハム (Graham) 等、ビロロジ (Virology) 、52巻、456頁 (1973年) 及びサウザーン (Southern) 等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス (J. Mol. Appl. Genet.) 1巻、327~341頁 (1982年) 参照。トランスホームした宿主細胞を、細胞増殖及びその組換えDNA発現に適合した条件下で培養し、発現したタンパク質を、従来法により収獲した。

e. イーストにおけるプレh u T F hの発現

S. セレビシアス (cerevisiae) において、プレh u T F h遺伝子を発現できる組換えDNA分子を、先に述べたように、

5'-AATTCCTCCGGG-3'

5'-CGCTCCGGG-3'

の配列をもつオリゴヌクレオチド、アダプター断片を合成し、ついで例16aの1133bp断片の末端に、それを結合することにより構築した。このようにして作ったアダプター化した断片は、C1a1粘着末端をもつ。

イーストの発現ベクター、pTD1 (アメリカン・タイプ・ティッシュコレクション、#ATCC31255) を、制限エンドヌクレアーゼC1a1での消化により線状化した。上記のC1a1アダプター化1133bp断片及びC1a1消化ベクターを、T4DNAリガーゼを用いて、機能的に結合し、環状の組換えDNA

分子 pY-プレ h u T F h を作った。

大腸菌 RRI をプレ h u T F h でトランスフォームし、プレ h u T F h 構造遺伝子を発現するトランスフォーマントを、例 16 c で述べた方法により同定及び選別を行った。

f. イーストにおける h u T F h の発現

S. セレビシアエ (cerevisiae) において、h u T F h 構造遺伝子を発現できる組換え DNA 分子を、pY-プレ h u T F h の ClaI による消化により、第 2 図の残基 1~1125 番の配列に対応するスクレオチド配列を含む 1151 bp 断片を作ることによって構築した。サイズ分画による単離後、1151 bp 断片を BbvI で消化し、第 2 図の残基 164~1125 番の配列に対応するスクレオチド配列を含む 978 bp 断片を作った。この 978 bp 断片は、サイズ分画により単離した。

及び

の配列をもつ合成ポリスクレオチドアダプター断片を作り、先に述べたように、アニールすること、ClaI 及び BbvI 粘着末端をもつ DNA アダプターを作った。まず、このアダプター断片を、978 bp 断片に特異的に結合することにより、1020 bp 断片とした。つづいて、この 1020 bp 断片を、T4 DNA リガーゼを用い、例 16 c で述べられているように調製した ClaI 消化 pTDT1 ベクターと結合し、環状組換え DNA 分子 pY-h u T F h を作った。

組換え DNA 分子 pY-プレ h u T F h 及び pY-h u T F h を、内在する構造遺伝子によりコードされる h u T F h 又はプレ h u T F h タンパク質の発現に適合するイースト宿主媒体中に導

入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、S. セレビシアエ (cerevisiae) 細胞がある。

宿主細胞を、この組換え DNA 分子でトランスフォームし、選択培地で培養して、従来性により、トランスフォームした細胞を単離した。例えば、ハイネン (Hinnen) 等プロシーディング・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、75 巻、1929 頁 (1978 年) 及び、ミヤジマ (Miyajima) 等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.) 4 巻、407 頁 (1984 年) 参照。トランスフォームした細胞を、細胞増殖及び組換え DNA 発現に適合する条件下で培養し、ついでこの発現したタンパク質を従来法で収獲した。

g. 組換え h u T F h コード配列の発現による可溶性 h u T F h の生産

組換え DNA 分子からの可溶性 h u T F h の発現は、プレ h u T F h 及び h u T F h に対し、例 16 c で述べたのと同様に、種々の発現媒体で行なわれた。その例において、EcoRI 粘着末端を有する断片を含む 1133 bp のプレ h u T F h 構造遺伝子の例 16 a での作成と、つづいて、例 16 b-f での操作で、大腸菌、S. セレビシアエ (cerevisiae) 及び CHO 細胞の 3 種の発現媒体において、プレ h u T F h 又は h u T F h を発現できるベクターを作った。同様に、EcoRI 粘着末端を有する可溶性プレ h u T F h 構造遺伝子を含み、例 16 c で調製した 805 bp の断片を例 16 b-f で述べた方法に従って操作し、これら同発現媒体中可溶性プレ h u T F h 又は h u T F h を発現できる発現ベクター (すなわち、プレ h u T F h-TR 又は h u T F h-TR) を作った。

17. ポリペプチド p24-35 及び p159-169 による凝集阻害

第 7 表にそのアミノ酸残基配列を示した例 11 で述べたように合成した。

第 7 表

| ペプチド名 | アミノ酸残基配列 |
|----------|------------------------|
| p24-35 | K-EWEKPKVHGVYI-ON |
| p159-169 | K-IYLYYVWSSSSGKNTAK-ON |

a. 各ポリペプチド実験名は、第 1 図に含まれているアミノ酸残基配列を改変している。

それから、ポリペプチド p24-35 及び p159-169 について、例 12 で述べられているように、h u T F による凝集開始を競合的に阻害する能力を決定した。この研究の結果を第 12 図に示し、p24-35 及び p159-169 は、10 μ M 濃度で用いたとき、各々、h u T F で開始した凝集を、45% 及び 25% 阻害できることを示している。この研究において、第 12 図で白丸により示したこれらのペプチドに対する阻害バックグラウンドは、第 4 表で示した実験結果よりも低いことに注意しなければならない。結果として、この研究において、10 μ M 濃度での凝集阻害を少なくとも 20% 起こすポリペプチドは、h u T F 結合部位ポリペプチド類似物と考えた。

従って、ポリペプチド p24-35 及び p159-169 に本発明の h u T F h ポリペプチド結合部位類似物を示している。また、ポリペプチド p25-49 で得られた同様の結果を考慮すると、p24-35 で得られた結果は、h u T F h-因子 VII/VIII 結合部位は、これら 2 つのポリペプチドの共通部分、すなわち、

第 1 図で示した残基 30-35、(-V N Q V Y T-) のアミノ酸残基配列で作られていることを示していることに注目すべきである。

18. 抗 h u T F 抗体による凝集阻害の速度論

抗 h u T F 抗体が、h u T F の凝集開始を阻害できる時間を測定するため、この阻害の時間経過を、例 10 で述べた阻害検定法を用いて測定した。

例 7 で述べたように調製した、MAPS 単離化 T F B-5 G9 モノクローナル抗体およそ 1 ng を、100 μ g HBS/TBS 中、例 4 で述べたように調製した再結晶化 h u T F およそ 1 ng と混合した。このように形成した種々の混合物を、37°C で、約 1 から 60 分の間の種々の時間維持し、抗 h u T F 抗体を、h u T F と免疫学的に結合させ、免疫反応産物を作った。第 13 図で示した時間に、各混合物について、例 2 で述べたように、h u T F の凝集活性を決定し、ついで、例 10 で述べたように阻害率を示した。

第 13 図で、このような速度論的測定の結果は、この検定で用いた抗体及び精製した h u T F の濃度で、65% 以上の h u T F による凝集開始の阻害が、10 分以内に起こることを示すことが分る。より高い抗 h u T F 抗体濃度では、より速く、完全な阻害が起こると考えられる。

19. 抗 h u T F 抗体による、h u T F による凝集開始阻害の役与一応答

抗体役与範囲にわたる、h u T F 凝集開始を阻害する本発明の抗 h u T F 抗体の能力は、次の修正をした例で述べた方法により決定した。例 4 で調製した再結晶化 h u T F 1 ng を、0.1 μ g の HBS/BBSA 中、例 7 で述べたように単離した、種々の量の

TF8-5G9モノクローナル抗体と混合した。このように調製した混合物を維持して免疫反応産物を作り、ついで例10で述べたように、h u T F の凝集活性に関する検定を行った。

そのような投与-応答検定の結果を、第14図に示し、また、このことはこの研究で用いた h u T F 濃度に対し、 μg 当たり、およそ1~5 ng の抗 h u T F の最高値の半分の阻害を示している。

同様の投与-応答実験を、h u T F 源として溶解したヒト細胞を用いて行なった。

ヒトの繊維芽細胞系列 GM 1381 (NIGMS ヒューマン・ジュネティック・ミュータント・セル・レポジトリ) を、2 mM グルタミン、5% ウシ胎児活性及び抗生物質を補った、ダルベコ修正イーグル増地 (DMEM, NY州、グランドアイランド、ギブコラボラトリー) 中、37℃で、7% (v/v) 二酸化炭素空気雰囲気下で培養した。GM 1381細胞を増殖し、そして収穫し、さらに 3.0×10^5 個の細胞のペレットを遠心で調製し、-70℃で凍結した。この凍結ペレットを H N バッファ (25 mM ヘプス、140 mM NaCl、pH 7.0) 中の 15 mM ベータ、オクタグルコピラノシド溶液 9 μg を加えて急速に溶解し、さらに10分間37℃に維持して、細胞を溶解した後、H N 18 μg を加えて、細胞溶解物を作った。

例17で述べたように単離したモノクローナル抗体 TF8-5G9 を、第15図に示した種々の投与に対し、0.01% BSA (シグマ、R1A級) で希釈した。それから各抗体希釈物 25 μg に、先に調製した細胞溶解物 225 μg を加え、60分間37℃に保って、抗体を細胞溶解物中に存在する h u T F と免疫反応させ、免疫反応産物を形成させた。その後、25 mM CaCl₂、

50 μg を、免疫反応産物を含む溶液 50 μg と混合し、ついで、50 μg のクエン酸化ヒト血漿と混合し、凝集を開始させた。このようにして作った混合物を37℃に維持し、血漿の凝加と、凝血形成の間の時間を測定した。効果的 h u T F 濃度及び阻害率を例10に述べたように計算した。

h u T F 源として、ヒト GM 1381細胞溶解物を用いた投与-応答阻害検定からの結果を、第15図に示した。これらの結果は、TF8-5G9抗 h u T F 抗体が、 μg 当たり、およそ8-10 ng の抗体濃度で h u T F のこの細胞溶解物の半分の阻害を起こしたことを示している。

20. 非ヒト組織因子と M o A b の交差反応性

組織因子を、脳組織 (ラット、ラビット、子ウシ、イヌ、羊、ブタ及びヒト) 又は、組織培養細胞 (アフリカニドリザル腎臓 (COS) 細胞) から単離した。組織又は細胞を溶解し、膜をばき、ミンチし、組織 1 μg 当たり、1 μg の冷アセトン中でホモジネートし、ついで、凍干下、ワットマン #1ペーパーで透過した。この固体をアセトンに懸濁し、もう5回透過し、一晩空気乾燥したのち、-80℃で保存した。開始濃度の 16~19% を含むアセトン粉末を細かくしてから、5 $\mu\text{mol/L}$ EDT を含む TBS 中、5% (w/v) となるよう懸濁し、室温で1時間混合した。10,000 $\times g$ 、20℃、30分間の遠心で固体を集め、ついで T F 含有液を100,000 $\times g$ 、1時間の上清の遠心で集めた。このペレットを、TBSに懸濁し、-80℃に保存した。

動物 T F (T F 活性をもつ組織抽出物) による抗体阻害を、次のように測定した。等容量の T F (1 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$) 及びハイブリドーマ上清 (TBS/BSAでの10倍希釈物) を、37℃で2時間インキュベートした。残存する T F 活性を、そのインキュベ

ーション混合物 100 μg を、50 μg のヒト因子Ⅷ欠損血漿及び50 μg の50 mM CaCl₂ に添加することにより測定した。37℃、1分後、相同種の血清の10倍希釈物 50 μg を因子Ⅷ源として加え、凝血形成時間を2度測定した。

24個の M o A b のうちの18個がバブーン脳 T F 又は、アフリカニドリザル腎臓細胞抽出物のプロコアグラント活性を阻害した (第8表)。しかし、M o A b のいずれも、ラット、ウサギ、子ウシ、イヌ、羊又はブタの T F と、交差反応を示さなかった。すなわち、相同種の因子Ⅷ源の存在下、ヒト因子Ⅷ欠損血漿のリカルシフィケーション時間促進能を示す T F 調製物ではなかった。抗体のいずれも、正常なヒト血漿での検定による、ウサギ T F のコアグラント活性を示さなかった。

第 8 表

| M o A b | アイソタイプ | RIA ^a (cpm) | ラット ブラット | ウサギ R | 子ウシ NR | 阻害率 % 凝血 ^b | 動物 Ⅷ ^c | 動物 の阻害 |
|-----------|----------------|---------------------------|-------------|----------|-----------|--------------------------|----------------------|-----------|
| TF8-5C4 | IgG1, κ | 6242 | + | ± | + | 96 | 57 | -- |
| TF8-5G9 | IgG1, κ | 28587 | + | - | + | 99 | 80 | -- |
| TF8-11D12 | IgG1, κ | 29453 | + | - | + | 99 | 82 | -- |
| TF9-1F1 | IgG1, κ | 25133 | + | + | + | 95 | 83 | M.3 |
| TF9-1D5 | IgG1, κ | 3872 | + | + | + | 95 | 76 | M.3 |
| TF9-1B7 | IgG1, κ | 28586 | + | + | + | 97 | 90 | M.3 |
| TF9-1B8 | IgG1, κ | 28552 | + | + | + | 98 | 83 | M.3 |
| TF9-1B9 | IgG1, κ | 28523 | + | + | + | 97 | 84 | M.3 |
| TF9-2C4 | IgG1, κ | 24435 | + | + | + | 97 | 78 | M.3 |
| TF9-2F5 | IgG1, κ | 27422 | + | + | + | 97 | 79 | M.3 |
| TF9-4D11 | IgG1, κ | 25994 | + | + | + | 97 | 81 | M.3 |
| TF9-5G4 | IgG1, κ | 24073 | + | + | + | 97 | 83 | M.3 |
| TF9-5B7 | IgG1, κ | 25819 | + | + | + | 97 | 74 | M.3 |
| TF9-5C7 | IgG1, κ | 24543 | + | + | + | 96 | 72 | M.3 |
| TF9-6B4 | IgG1, κ | 17894 | + | + | + | 96 | 98* | M.3 |
| TF9-6C4 | IgG1, κ | 24065 | + | + | + | 95 | 78 | M.3 |
| TF9-6C9 | IgG1, κ | 8054 | + | + | + | 95 | 47 | -- |
| TF9-7E10 | IgG1, κ | 8025 | + | + | + | 97 | 54 | -- |
| TF9-8E3 | IgG1, κ | 29152 | + | + | + | 97 | 76 | M.3 |
| TF9-9E1 | IgG1, κ | 18169 | + | + | + | 90 | 71 | M.3 |
| TF9-9C3 | IgG1, κ | 30222 | + | + | + | 97 | 82 | M.3 |
| TF9-9B4 | IgG1, κ | 33728 | + | + | + | 95 | 82 | M.3 |
| TF9-10C2 | IgG1, κ | 28692 | + | + | + | 98 | 71 | M.3 |
| TF9-10B10 | IgG1, κ | 24585 | + | + | + | 0 | 20* | -- |
| PA6100 | IgG1, κ | 1929 | - | - | - | 0 | 0* | -- |

第 9 表

モノクローナル抗体TF8-5G9による、

種々の細胞及び組織の凝血活性の阻害

| TF活性源 | TF活性(%) | | |
|------------------|---------|-----------|-----------|
| | 抗体なし | TF8-5G9 | TF8-5G9 |
| 精製ヒト脳TF | 1569 | 1520 (3%) | 245 (84%) |
| 粗脳抽出物 | 2059 | 2059 (0%) | 411 (80%) |
| 粗胎盤抽出物 | 1287 | 1344 (0%) | 159 (88%) |
| GM1381繊維芽細胞(溶解化) | 990 | 956 (2%) | 143 (86%) |
| ヒト単球(溶解化) | 2893 | 2745 (5%) | 176 (94%) |
| J82 膀胱がん細胞(溶解化) | 882 | 902 (0%) | 93 (89%) |
| ウサギのトロンボプラステン | 2106 | 2108 (0%) | 2157 (0%) |

- 特にことわらないかぎり、全ての結果は、ハイブリドーマ細胞培養上清の10倍希釈物を用いて得られたものである。毎分当りのカウント数(cps)で表わされているラジオイムノアッセイの結果は、ラクトペーオキシゲナーゼを使ってラベルした¹²⁵I-TFを用いている。
- 還元(R)又は非還元(NR)のTFを用いて行ったウェスタンブロット。
- 精製したヒトの脳TFによって誘導されるヒト血漿の凝結の阻害。
- J82細胞に対する特異的¹²⁵I-因子Ⅷ/Ⅷa結合の阻害。
- 粗ヒト脳抽出物(B)又は溶解COS細胞(M)により誘導されるヒト血漿凝結阻害。M・Abが60%以上の凝血活性を阻害するとき、文字がその種の場所に入れている。

種々のヒト細胞及び組織により発現される凝血活性の阻害をM・Ab TF8-5G9を用いて詳細に試験した。TF8-5G9は、1gG濃度 $\geq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のときの90%以上、精製再脂質化したヒトTFの凝結を中和する(第15図)。ヒトの細胞溶解物及び粗組織抽出物の凝血活性を阻害する、このM・Abの能力も示されている(第9表)。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の1gG濃度でのTF8-5G9は、粗脳及び胎盤のアセトン粉末及び溶解したヒトの線維芽細胞、膀胱がん細胞及び内毒素活性化末梢血液単核細胞の凝血活性の80%以上を定量的に阻害する。

- 精製したヒト脳TFを、テスト前にリビロトビヒクルに再精成した。
- 右の2つの図は、指示されている精製1gGで処理した後測定した、ミリユニットで表わした残留TF活性の2回の平均値が示されている。残存するTF活性の測定前、サンプルを37℃で20分間、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の1gGとインキュベートした。カップ内の値は、抗体なしの同サンプル活性ユニットに対する阻害率が示されている。

21. 因子Ⅷ結合の研究

因子Ⅷ/ⅧaのTFへの結合は、機能的TF:Ⅷ/Ⅷa複合体形成複合体の集合に必要とされるので、因子Ⅷ/ⅧaのTFに対する結合を妨げることによる、第8表に示したM・AbのTF活性中和能がテストされた。

ヒトの組織因子仲介による、因子ⅧのJ82の膀胱がん細胞表面への結合はよく調べられている。フェア(Fair)等、ジャー

ナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 262巻、11692(1987年)。従って、細胞表面hTF:Ⅷ/Ⅷa複合体の集合に関するM・Abの効果は、J82細胞を、抗体とブレインキュベートし、さらに、¹²⁵I-因子Ⅷ/Ⅷaの特異的結合を定量的にすることにより試験した。

J82細胞を12穴培養プレート中、フェア(Fair)等によって報告されているように(上述)、気密化するまで培養し、バッファA(137mM NaCl、4mM KCl、11mM 2-メルカプトエタノール、5mM アジ化ナトリウム、10mM ヘプス、pH 7.45)で洗浄し、ついで、精製したM・Ab 1gG又は、ハイブリドーマ培養上清10倍希釈物を含むバッファA 0.7mlとともに、37℃で2時間インキュベートした。塩化カルシウム及び、¹²⁵I-因子Ⅷ/Ⅷaを各々、最終濃度5mM及び1mMとなるよう添加し、さらに37℃、2時間インキュベートした。その後、細胞単層を、冷バッファB(140mM NaCl、0.5% BSA、5mM トリスHCl、pH 7.45)で5回洗浄し、1mlの0.2M NaOH、1% SDS、10mM EDTA溶液中で溶解し、その溶解物のガンマ線をカウントした。特異的結合は(非ラベル因子Ⅷ/Ⅷaを100倍過剰存在下、細胞と混合する¹²⁵I-因子Ⅷ/Ⅷa)、非特異的結合放射活性を差し引いて測定した。特異的結合の阻害率は9容のバッファAと、1容の培養培地で処理したコントロール細胞に対する、M・Abで処理したJ82細胞という形で測定した。

因子Ⅷ/ⅧaがTFに結合したとき、それはうまく取り込まれないが、抗体結合によるTFインターナライゼーションの可能性を排除するため、J82細胞を、5mM アジ化ナトリウムで代謝的に毒殺した。細胞のアジ処理の有無にかかわらず同じ結果が得られ

た。

この研究の結果は、上の第8表に示されている。TF活性を阻害する全ての23個のM・Abは、因子Ⅷ/Ⅷa結合も阻害した。予想されるように、TF活性を阻害しないM・Ab、TF9-10H10は、因子Ⅷの結合を阻害しなかった。

22. J82細胞による因子X形成の阻害

J82細胞上でのhTF:Ⅷ/Ⅷa複合体による因子X形成速度を、次の修正をした、フェア(Fair)等(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 262巻、11692頁(1987年))により報告された、多穴培養プレート検定法を用いて2度定量化した。細胞を、12穴プレート中で培養し、J82細胞への因子Ⅷ/Ⅷa結合の際に上述したように、検定開始前、種々の濃度の精製した、M・Abの1gG 50%と37℃で2時間ブレインキュベートした。単一の濃度の因子Ⅷ/Ⅷa(1mM)を検定で採用した。因子Xを最終濃度50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加した後、5、10、15分の間隔で、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の上清を採取し、550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の50mM トリス-HCl、225mM NaCl、50mM EDTA(pH 8.2)の溶液中に入れた。発色性因子Xaを添加後(TX州、ビュート、ヘナラプ社、2.4mM S-2222 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、速度論的分析モジュールをつけたベクマンDU-30分光器で405nmの吸光度の増加を測定することにより、因子Xの活性を定量化した。因子Ⅷ/Ⅷa非存在下でインキュベートしたJ82細胞上清のS-2222加水分解によるバックグラウンドを各測定値から差し引いた。抗体処理の阻害率は抗体とのブレインキュベーションなしの細胞に対して計算した。

M・Ab TF9-2C4及びTF9-5B7によるJ82細胞

の処理に対する阻害曲線は、因子X・形成速度が、因子V結合を阻害したものと同様の抗体濃度で阻害されることを示している(第17図)。非阻害的(非中和性)M₀Ab T F 9-10 H 10は1g濃度10μg/mlまで、凝血促進活性、因子V/V_a結合又は因子X・生成速度にほとんど影響を与えないし、また、コントロールM₀Ab P Ab 100は全く効果がない(データ示さず)。

23. h u T F h ポリペプチドの因子V/V_aへの親和的結合による、J 82細胞上での因子X活性化の阻害

当分野ではよく知られているように、凝血促進プロテアーゼカスケードの細胞活性化は、消費性血栓出血症と呼ばれる種々の病態に関連している。一般に、凝血促進プロテアーゼカスケードは、膜レセプター及び基本的共因子、組織因子(TF)に対する因子V/V_aの高い親和性による発現により、細胞表面で開始する。TF及び因子V/V_aの二分子凝血促進複合体(TF:V/V_a)は、最終的にトロンビン形成及びフィブリンの析出につながる限定したタンパク質分解による因子X及びⅤの活性化を起こす。さらに、凝血におけるTFの役割、TFによる凝血プロテアーゼカスケードの開始は、播種性血管内凝固及びトロンボジェネシスと関連する。ニューマツ(Niemetz)等、ブラッド(Blood)42巻、47頁(1973年)及びベリラクア(Berilacqua)等、ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディスン(J. Exp. Med.)160巻、618頁(1984年)。TFは、炎症性仲介物に対する応答及び細胞性免疫応答で、単球及び内皮細胞の表面で発現する重要なエフェクター分子である。

本発明のh u T F h ポリペプチドが、因子V/V_aに結合し、それにより、因子Xを活性化することができる、TF:V/V_a

複合体の形成を阻害する能力を研究した。

T B S 中、100μMのh u T F h ポリペプチド類似物を含む溶液50マイクロリットル(μl)を、96穴平底ポリスチレン検定プレート(各ウエル96個)に入れ、ついでその各ウエルに、例8で述べたように準備した、T B S 中1μMの濃度に調整した因子V/V_aを含む溶液25μlを加え、さらに、T B S 中20mMの塩化カルシウム25μlを加え、その混合物を30分間室温に維持した。

ヒト膀胱がん細胞J 82細胞を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC HTB1;MD州、ロックビル)から入手し、参考としてここに記述されているフェア(Fair)等の方法(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、262巻、11692-11698頁(1987年))に従って培養した。

50μMのT B S に5×10⁴個のJ 82細胞を懸濁し、上述の維持を行った後、ポリスチレン検定プレートの各ウエルに入れた。その後、ただちに、フェア(Fair)等の報告のように(上述)準備した、T B S 中100μMの濃度の因子X 25μl及び、X_a発色基質S-2222(1mg/ml T B S) 50μlを加え混合し、その混合物を2分間室温に維持して、発色反応産物を含む溶液とした。

生成した発色産物量を、V-max 96穴スペクトロホトメータ(カリホルニア、マウンテン・ビュー、モレキュラー・デバイス社)を用い、405ナノメータ(nm)での光学密度(O.D.)を測定して定量した。ポリペプチドの代りにT B S を用いるか、又は、因子V無添加のコントロールも測定し最高及び最低O.D.値を決定した。これら阻害の測定結果を第10表に示す。

第10表

h u T F h ポリペプチドを用いたJ82細胞に関するX活性化の阻害

| h u T F h ポリペプチド | 光学密度 ¹ |
|-----------------------|-------------------|
| P B S | 0.960 ± 0.083 |
| 因子V/V _a なし | 0.005 ± 0.001 |
| p 1-18 | 1.007 ± 0.087 |
| p 1-30 | 1.098 ± 0.028 |
| p 11-28 | 0.687 ± 0.071 |
| p 24-35 | 0.477 ± 0.017 |
| p 26-49 | 0.437 ± 0.020 |
| p 40-71 | 0.814 ± 0.053 |
| p 72-104 | 0.781 ± 0.047 |
| p 94-123 | 0.818 ± 0.055 |
| p 121-155 | 0.889 ± 0.067 |
| p 144-159 | 0.507 ± 0.053 |
| p 146-167 | 0.004 ± 0.001 |
| p 157-169 | 0.389 ± 0.035 |
| p 161-190 | 0.600 ± 0.023 |
| p 190-209 | 0.625 ± 0.031 |
| p 204-226 | 0.715 ± 0.042 |
| p 244-263 | 0.619 ± 0.047 |

1. もし、光学密度(O. D.)が約0.500以下なら、因子Xの活性化の阻害は有意であると考えた。

本研究の結果は、h u T F h ポリペプチドp 24-35、p 26-49、p 144-159、p 146-167及びp 157-169は、因子V/V_aに結合し、因子Xを活性化できる、TF:V/V_a複合体の形成を阻害することを示している。これらの

結果は、本発明のh u T F h 結合部位ポリペプチド類似物が凝血を阻害するのに用いることができることを示している。

24. 抗h u T F h M₀Abによる凝血の生体内での阻害

しばしば、グラム陰性細菌による腐敗症は、最終的に死に至らしめるショック状態を起こす。このヘモスタチスシステムの乱れは、このショック状態の展開と密接に関連している。テイラー(Taylor)等(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスタゲーション(J. Clin. Invest.)79巻、918-825頁(1987年))は、外科的に加えられた活性化した、タンパク質C、天然の抗凝血酵素、は、凝血応答及びヒヒにおけるL D₅₀の大腸菌濃度の致命的効果を妨害する。

本発明の抗凝血M₀Abの生体内における凝血阻害能力を、テイラー(Taylor)等(上述)によって報告された腐敗ショックのヒヒモデルを用いて試験してみた。重さを計った7-8のヒヒを実験前一日絶食し、実験の朝、ケタミン(筋肉注射、14mg/kg)で麻酔化した。ついで、ペントバルビタール酸ナトリウムを、経皮カテーテルを通し、頭の静脈に投与し、軽いレベルの外科的麻酔状態に維持した(約45分毎2mg/kg)。大腿部静脈を無菌的に露出させ、血液採取の為1方の後足にカニューレを差込んだ。経皮カテーテルは大腸菌及び例20で示した、M₀Ab T F 9-5 B 7を含む試料を与え、ヒヒのTFと交差反応させるのに用いた。30分間の平衡化時間の後、この動物に約10分間わたって、M₀Ab T F 9-5 B 7 500μg/kg又は15μg/kg(例7で述べたように準備し、ついで無菌生理食塩水に透析し、0.58μg/mlの濃度としたもの)又は、無関係のM₀Ab 500μg/kgを与えた。

M₀Ab投与及び30分間の平衡化の後、各動物は、L D₅₀...

の大腸菌の投与を受けた(約 10^{10} 個、投与後約8~16時間で敗血症ショックのため死をもたす量である)。大腸菌は2時間に液り注入により投与した。この研究結果を第11表に示す。

第11表

ヒトの敗血症ショックによる致死の生体内における阻止

| グループ | NoAb | 投与 μg/kg | 高血圧 | 大腸菌 注入 | 死 |
|------------|---------|-------------|--------|-----------|-----|
| I. コントロール | TF9-5B7 | 500 | Normal | No | No |
| II. コントロール | HE* | 500 | Normal | Yes | Yes |
| III. 実験 | TF9-5B7 | 500 | Normal | Yes | No |
| | TF9-5B7 | 150 | Normal | Yes | No |

1. 血圧、酸素活性化及びフィブリン分解産物を含む種々のヘモスタチスパラメータは、M.O.Ab投与後、大腸菌注入前に測定した。

2. HBは、TF9-5B7と同じ類及び亜種のM.O.Abであるが、無関係の抗原と免疫反応を起こす。

第11表にみられるとおり、M.O.Ab TF9-5B7を受けたヒトはLD₅₀の大腸菌の投与に対しても生存しつづけた。NoAb 150 μg/kg及び500 μg/kgの両投与で保護された。さらに、コアグロパシーと関係する、顕著な低血圧、酸素カスケード活性化およびフィブリンの分解は、M.O.Ab TF9-5B7を受けた動物で著しく緩和された。

25. ヘモグロビン・アルファ鎖としての、58 kDa h.u.TFヘテロダイマー鎖鎖の特徴

免疫親和性単離したTFをさらにウェスタン・ブロット分析で特性を調べ、58 kDa h.u.TFヘテロダイマーの成分、すなわち、例4で述べた47 kDa及び125 kDaタンパク質を同定した。

なるという結論を支持している。

従って、現在、例4で述べられている58 kDaヘテロダイマーの125 kDa軽鎖成分は、ヘモグロビンのアルファ鎖であり、47 kDa h.u.TFタンパク質との会合は、h.u.TF単離操作のアーテファクトであると考えられている。

例1~25の結果のまとめと討論

2つの異なる細胞融合体由来の、ヒトTFに対する、24種のM.O.Abライブラリーについて報告されている。各M.O.Abの免疫特異性は、フットプロット、ウェスタンブロット及びラジオイムノアッセイにより特徴づけられた。ほとんどのM.O.Abは、全ての3条件下、ヒトの本来のTF及び変性TFと反応した。M.O.Abの1つ、TF8-5G9は、TFタンパク質のルーチンな精製にうまく使用することができる。それは組織抽出物由来のTF活性を吸着し、ミリグラム量の精製ヒトTFを一定して与える。

M.O.Abの1つ以外の全ては、精製したヒトTFの機能活性を強く中和する。いくつかのM.O.Abは、ヒト及びサルTFと交差反応をすることが分っているが、相関的因子の存在下、ラット、ウサギ、子ウシ、イヌ、羊、又はブタのトロンボプラスチンにより開始した因子Ⅲ欠損ヒト血漿の凝集を、どの抗体も阻害しなかった。さらに、ウサギトロンボプラスチンによる正常なヒト血漿の凝集開始は、どの抗体によっても阻害を受けず、このことは、ヒトTF凝集活性の阻害は、因子Ⅲ/Ⅳを含む、可溶性血漿凝集タンパク質への抗体の妨害によるものではないという結論を支持する。

抗TFによるTF凝集活性の阻害に対する最も明瞭な原因は、因子Ⅲ/Ⅳ結合のブロックである。予想されたとおり、全部で

例6.cで述べたように行った、ウェスタンブロット分析を、電気泳動するサンプルとして、例9で述べたように調製した、免疫親和性により単離したh.u.TF、精製したヒトヘモグロビン、又は、分子重量標準を用いて行った。指示されているところではグルフィド結合の還元のため、サンプルバッファの中に50 mMジチオスレイトールを含めた。ウェスタンブロットを、非免疫化ウサギIgG、従来の方法で調製したウサギ抗h.u.TF IgG又は、ダコ(Dako)(カリフォルニア、サンタバーバラ)社から入手したウサギ抗ヒトヘモグロビンIgGを用いて、示されているように免疫反応した。最初の2つのIgG調製物は、例7で述べたように単離したMAPS-Ⅱである。

上で述べたウェスタンブロット分析の結果は、第18図に示した。抗h.u.TF IgGは、還元型h.u.TFの47 kDaのバンドとのみ免疫反応を起こし、125 kDaのバンドとは反応しなかった(パネルA、レーン3)。一方、同IgGは、非還元型h.u.TFの58 kDa及び47 kDaの両バンドと免疫反応を起こした(パネルA、レーン4)。これらの結果は、58 kDaヘテロダイマーの47 kDa成分としてのh.u.TFの同定と一致している。抗ヘモグロビンIgGは、非還元型h.u.TFサンプル中の58 kDaバンドとのみ免疫反応を起こし、47 kDaのモノマーとは反応しなかった(パネルB、レーン4)。しかし、抗ヘモグロビンIgGは、還元型のh.u.TFサンプル中の125 kDaバンドと免疫反応し(パネルB、レーン3)また、125 kDaの精製したヒトヘモグロビン・タンパク質と免疫反応した(パネルB、レーン2)。非免疫ウサギIgGとの反応はなかった。

上記の結果は、非還元型h.u.TFの58 kDaの分子は、グルフィド結合でヘモグロビンと結合した47 kDa h.u.TFから

23個の抗凝血(中和性)M.O.Abは、TFの基本的レセプター機能と一致して、J82細胞への因子Ⅲ/Ⅳの特異的結合を妨ぐ。さらに、このことは、因子Ⅲ結合及び、因子Ⅲ形成速度の阻害のハーフ・マキシマルが同じIgG濃度のときに起こる、選択した精製M.O.Abの投与測定においても実証される。

ヒトTFに対するM.O.Abは、最近、カーソン(Carson)等(ブラッド(Blood)、70巻、490頁(1987年))により、これを直接試験したのではないが、因子Ⅲ/Ⅳ結合の妨害によることは明白に、TF活性を阻害するものであると報告された。24個のここで述べられているM.O.Abのうちの23個が、TF活性を強く中和するという知見は注目値する。種のヒト凝集タンパク質に対するM.O.Abを用いた当出願者の研究室で行った実験は、少数の割合のものが機能活性を中和するというものである。基本的TFとの交差反応性が含む、反応性が各々異なることから、ハイブリドマ全てが兄弟クローンであるとは思えない。さらに、進行中のエピトープマッピング研究は、この種のM.O.Abに少なくとも3つの別々の非結合抗体結合部位が確認されることを示している。それゆえ、TFに対するM.O.Abを中和する大部分のものは、機能にも関係するわずかな免疫的に優勢なエピトープによるものでもないらしい。事実、ホプ(Hopp)等により(モレキュラー・イムノロジー(Mol. Immunol.)20巻、483頁(1983年))TFのアミノ酸配列は、多くの抗原決定基を含んでいることが報告されている。

小さいサイズのTFは、なぜ、そんなに多くの抗TF M.O.Abが因子Ⅲ/Ⅳ結合をブロックするのかを部分的に説明している。TFは、cDNAクローニングにより、グルコシル化を脱いて、25 kDaの細胞外ドメインをもつことが予想されている。それ

ゆえ抗体及び因子Ⅷ／Ⅷ_a分子は、より小さいTFの細胞外ドメインへの結合に立体障害を示しことになる。この立体障害仮説は、TF上の炭化水素鎖がおそらく機能には必要ないことから（ナカムラ（Nakamura）、トロンボヘモスタチス（*Throm. Hemost.*）58巻、135頁（1987年））、コンカナバリンAはTF活性を阻害する（ピトリック（Pitlick）ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション（*J. Clin. Invest.*）55巻、175頁（1975年））という観察と一致する。

それは、種々の細胞及び組織により発現した因子Ⅷ依存凝血活性は、同様の機能をもつ、1つ以上の分子種に寄因するというように、いくらか関連している。しかし、MoAb TF8-5G9は組織及び胎盤抽出物及び溶解した繊維芽細胞、肝臓がん細胞及び末梢単核細胞の凝血活性を定量的に阻害する。完全ではないが、これらの結果は、現にTFに寄因する細胞性凝血活性は、同一ではないときも抗原的に関連しているという結論を支持している。このことは、TFに対する単一の遺伝子がおそらく存在しているという知見と一致している。

最近、敗血症性ショックの致死効果は、凝血プロテアーゼカスケードにおいて、中間段階での役割を果たしている抗凝血タンパク質、活性化したタンパク質Cを注入することにより、ヒトにおいて妨げることができることが示されている。本研究は、TF活性を阻害するMoAbは、凝血プロテアーゼカスケードの開始のブロックにより、それらが、血管内凝血の病理学的活性化と通常関連している、血漿凝血因子の消費を防ぐので、生体内で、非常に特異性の高い抗凝血剤であることを示している。

例4で述べた58kDa型のh_uTFは47kDaのTFタンパク質と、現在では免疫化学的にまた部分的アミノ酸配列により、

ヘモグロビンのアルファ鎖と同一化されている、およそ12.5kDaのポリペプチド、ジスルフィド結合で結合しているヘテロダイマーであることが示されている。58kDaのヘテロダイマーが、早期の途中で形成されているらしいので、58kDaのバンドは、天然の細胞性TFのヘテロダイマー型であるという以前の推察は誤りであるだろう。

ヘモグロビンのアルファ鎖は、1つのシステインをもち、またTFは、cDNAから、その細胞質ドメインに1つのシステインを有することが予想される。またTFは、細胞外ドメインには4個のシステインをもつが、TF機能が還元により失われることから、少なくとも2つが膜内ジスルフィド結合に使われているはずである。TFの細胞質ドメイン中の1つのシステインは、ほとんどの細胞質ゾルタンパク質中のシステインのように、還元型で維持されているだろう。この（TFの他のシステインは、ありそうもない）システインは、細胞溶解後、混合ジスルフィド形成のため容易にアクセスでき、そして、早期塩析間での酸化で、TFの細胞質及びヘモグロビンのシステイン間でジスルフィド結合が形成すると提議される。この結論は、ヘテロダイマー形成は、明らかに時間依存性があり、臨アセトン粉末由来のTFの界面活性剤抽出と、免疫親和性マトリックスへの結合との間の時間を小さくすることが、得られるヘテロダイマーTF量を減少させる観察を支持する。推定される96kDaのTFダイマーも、早期の膜同様のメカニズムで形成するであろう。

抗ヘモグロビン抗体カラムは、3つの58kDaのヘテロダイマーを特異的に結合したが、免疫親和性で精製したTF調製物中に既述である高分子量種全てを定量的に除くことはなかった。47kDa以上の分子量をもつ他の底層量のマイナーバンドは、

抗TF抗体との反応で観察された。58kDaバンドの一部を含む、これらマイナーな分子種は、TFと他の未同定タンパク質間で形成された、混合ジスルフィド結合物を示している。

特別の証拠及び例を含む先の明細は、本発明の説明を意図したものであり、これを限定するものではない。多くの他の変化や、修正が、本発明の精神や範囲を逸脱することなく行うことができる。

| | -30 | -20 | -10 | |
|------------|-------------|------------|------------|--|
| ME | TPAWPRVPRP | ETAVARTLLL | GHVFAQVAGA | |
| 10 | 20 | 30 | 40 | |
| SGTINTVAAY | NLTWKSTNFK | TILEWEKXPV | NQVYTVQIST | |
| 50 | 60 | 70 | 80 | |
| KSGDWKSKCF | YTTDTTECDLT | DEIVKDVKQT | YLARVFSYPA | |
| 90 | 100 | 110 | 120 | |
| GNVESTGSAG | EPLYENSPEP | TPYLETNLQ | PTIQSFQVGC | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | |
| TKVNVTVDEZ | RTLVRNNTF | LSLRDVFGKD | LIYTLYYWKS | |
| 170 | 180 | 190 | 200 | |
| SSSGKKTAKT | NTNEFLIDVD | KGENYCFVSQ | AVIPSRTVNR | |
| 210 | 220 | 230 | 240 | |
| KSTDSPVECM | GQEXGEFREI | FYIIGAVVTV | VIILVIILAI | |
| 250 | 260 | | | |
| SLHXCRKAGV | GQSWKENSPL | NVS | | |

FIG. 1

FIG. 3

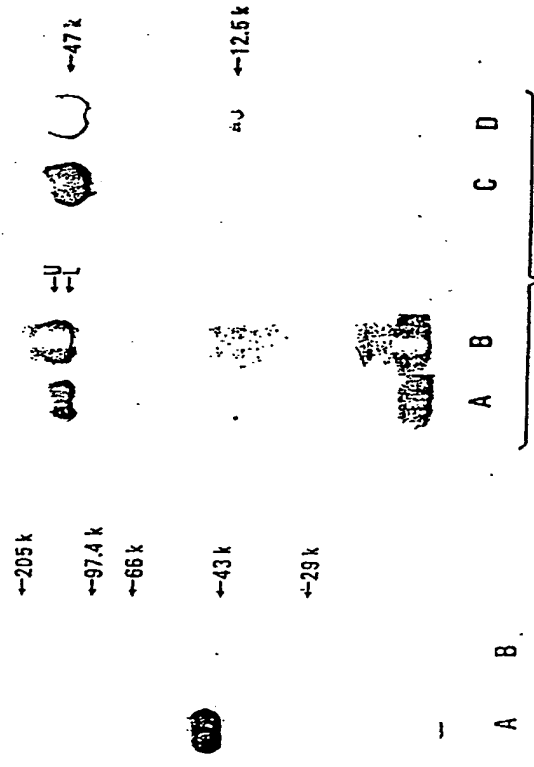
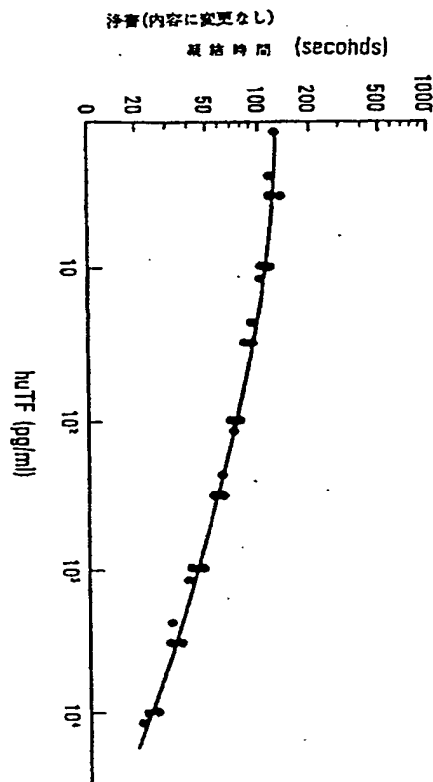


FIG. 4

FIG. 5

FIG. 2-1

N E T P A U P R V V R P E T A V A R I
 C T T C G C T C G A T C T C C C C C A A C T C C T A G A C A T G G A G C C C C T C C T C C G C C G C C C C G A G C C G C T C C C T C C G A C G
 10 20 30 40 50 60 70 80 90
 L L L C U V F A Q V A G A S C T T N T V A A Y N L T V K S T
 C T C T C T C G C T C C T T C C C C A G C T C C C C G C T T C A G C A C T A C A A T A G T T G C C A G A T A T A T T A G T T C A A T C A A C T
 100 110 120 130 140 150 160 170 180
 N F K T I L E U E P K P V N Q V Y T V Q I S T K S G D V K S
 A T T T C A G A C A T T T T C A G T G G A C C C A A C C C G T C A A T G T A C A G T T T C A A T A G C A C T A G T C A G A T T C A A A G C
 190 200 210 220 230 240 250 260 270
 K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V K Q T Y L A R V F S
 A A T C C T T T T A C A C A G A C A G A C A G T T G A C G T C A C G A T T T G A C A G T T C A G C A G C T A G T T G C A C C G C T T C T C C
 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 Y P A G N V E S T G S A C E P L Y E N S P E F T P Y L E T N
 T A C C C C A C C A A T G T C A C A C C G C T T C T C C C A C C G T T G T A T C A A A G T T C C C A G A G T T C A C A G T T A C T C G C A G A A A C
 370 380 390 400 410 420 430 440 450
 L C Q P T I Q S F E Q V G T K V N V T V E D E R T L V R R N
 C T C C A C C C A A A T T C A G C T T T T G A A C G T G G A A A A G T G A T G T C A C C T A G A A G A T G A C G G A G T T T A G T C A G A G A C
 460 470 480 490 500 510 520 530 540

N T F L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y V K S S S S G K K T
 A A C A T T C G T A A G C T C G G A T G T T T T G C A A G C A T T A T T A C A C T T A T T A T T C G A A T T C T C A G T T C A G A A A A A C A
 550 560 570 580 590 600 610 620 630
 A K T N T N E F L I D V D K G E N Y G F S V Q A V I P S R T
 G C C A A A C A A C A T A G C T T T T T C A T C A T A A A G C A A A A G T A C T T T T C A G T T C A C A C A G T G T C C T C C C A C A
 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 V N R K S T D S F V E C H G Q E K G E F R E I F Y I I G A V
 G T T A C C C A C A C T A C A C A C C C C T A G A G T G T A T G C C C C A G A A G C G A T T T C A G A A T A T T C A T C A T T C A C C T T G
 730 740 750 760 770 780 790 800 810
 V F V I I L V I I L A I S L H K C R K A G V G Q S V K E N
 G T A T T C G T C A T C A C T T G T C A T C T G G C T A T A T G T C T A C A C A G T T A G A A G C C A C C A C C A C C C C A C C T T C G A A C A C
 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 S P L N V S *
 T C C C A C T A A T T T T T C A A A G C A C T T T G A C T A C T G C A A T C G T A T T T C C A C T C T C C C A C A C T T T A C A C T C C C T A
 910 920 930 940 950 960 970 980 990
 G C A A A C C T T C C C A G A A C A A A T A A A G C A C A C T C C A G T G C A A G T C C A G C C A G C A A C C C A G C A T C C A C T T A C C
 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 A C C T T C A T A C C T C C C T C T C T T T T C G A A A C A C C
 1090 1100 1110 1120

FIG. 2-2

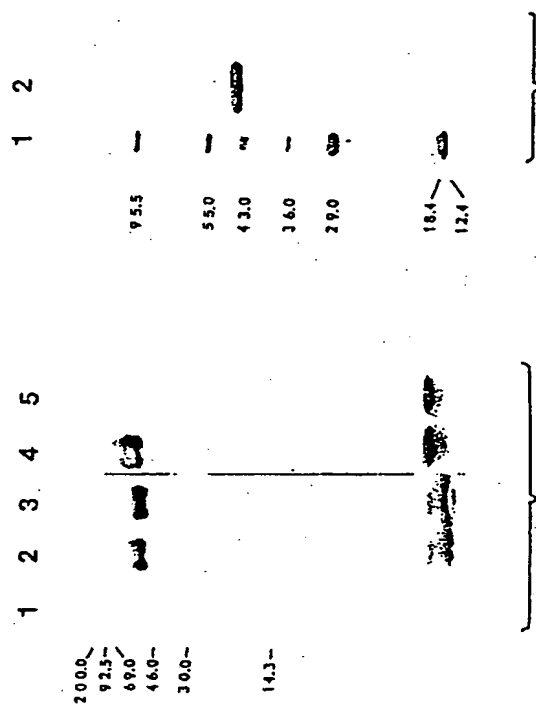
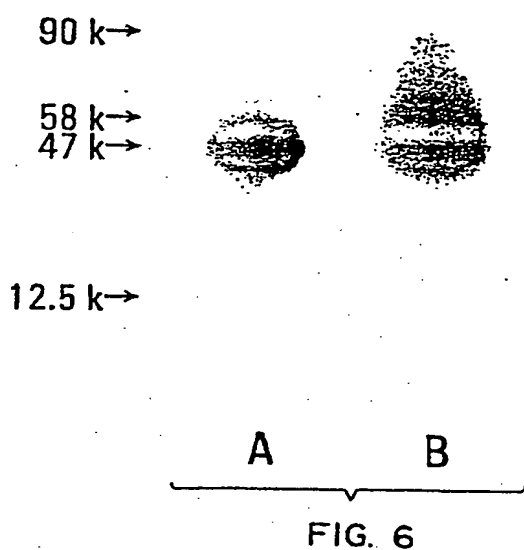
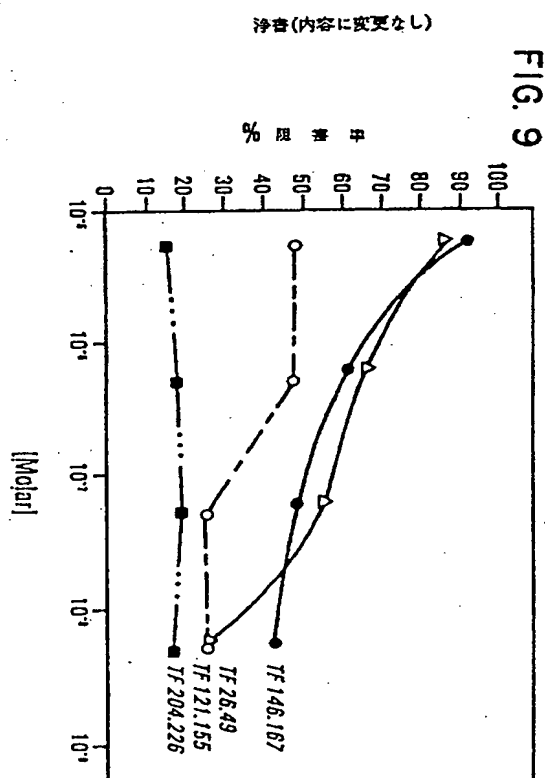
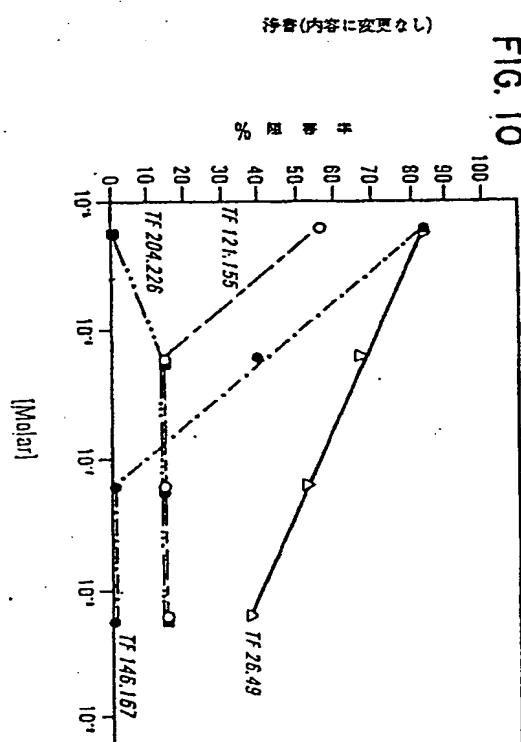


FIG. 8



非リソ酵素化TF-アミドによる
TF因子の還元性の阻害



リソ酵素化TF-アミドによる
因子の還元性の阻害

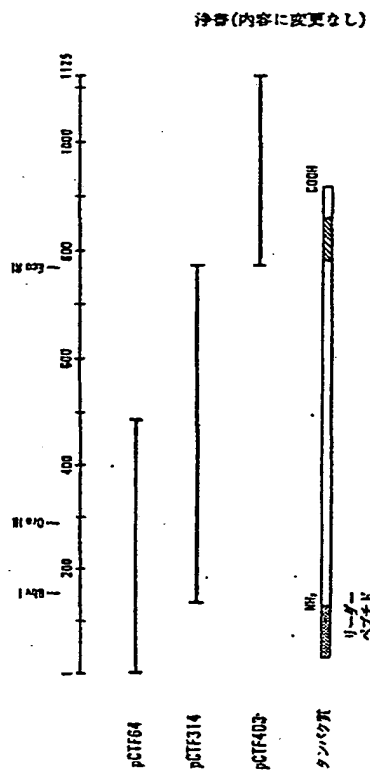


FIG. 11

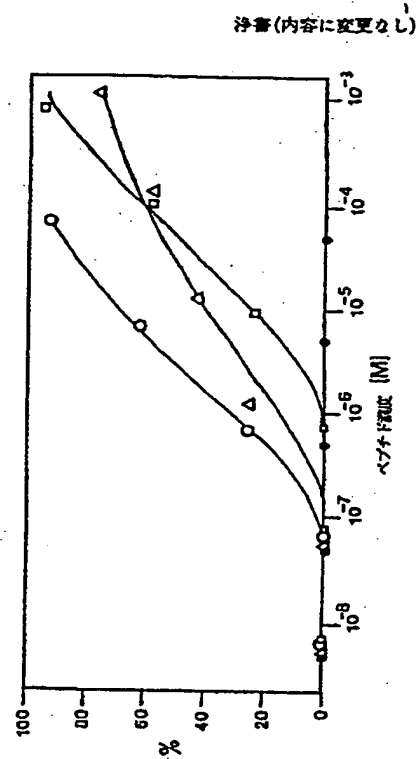


FIG. 12

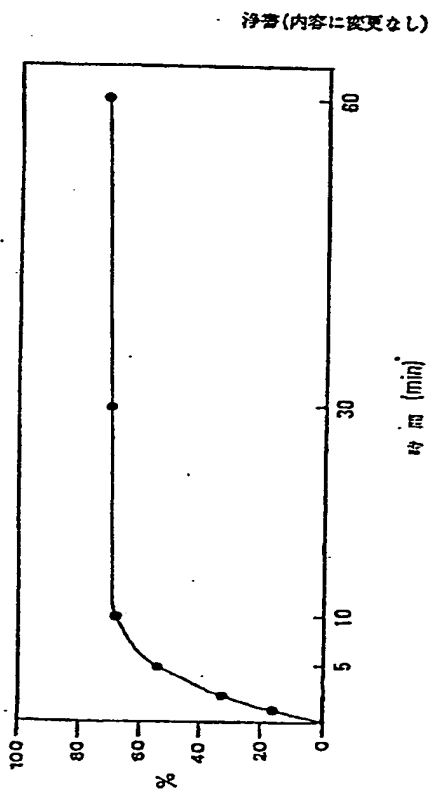


FIG. 13

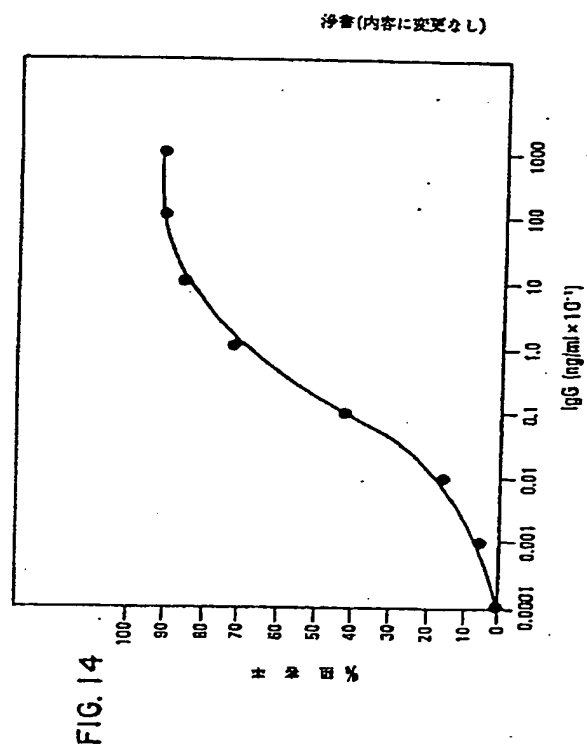


FIG. 14

浄重(内容に変更なし)

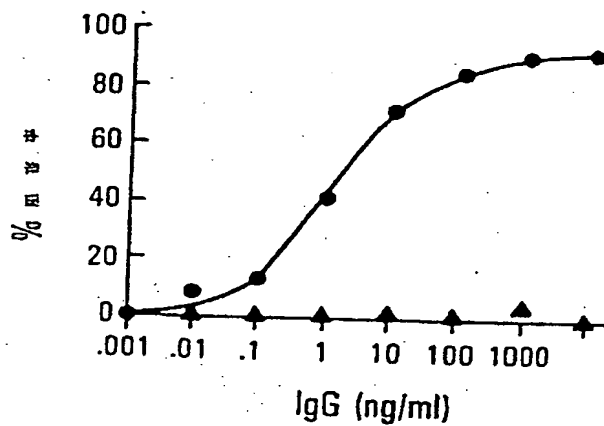


FIG. 16

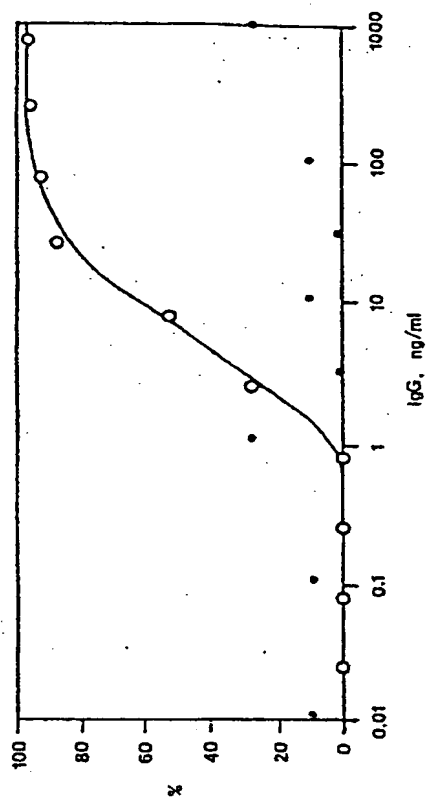


FIG. 15

浄重(内容に変更なし)

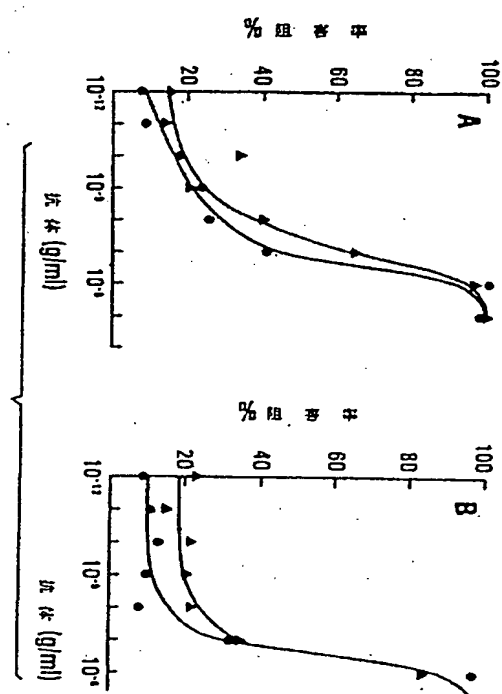


FIG. 17

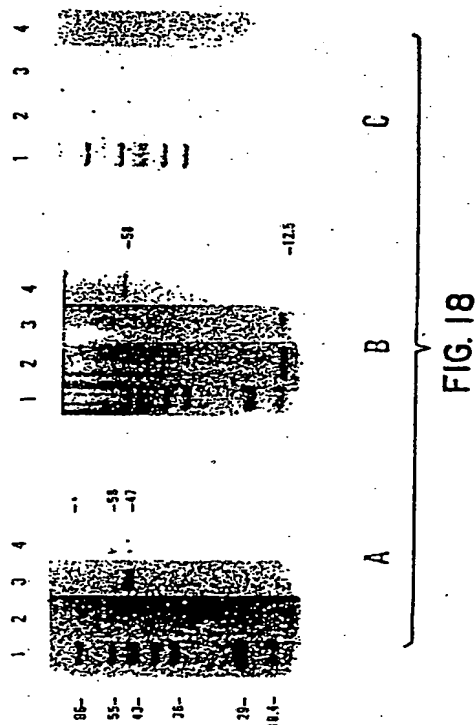


FIG. 18

手続補正書(方式) 1.8.31
平成 年 月 日

特許庁長官 吉田 文 毅 殿

1. 事件の表示 PCT/US88/00998
2. 発明の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ポリペプチド及び抗体
3. 補正をする者
事件との関係 出 願 人
名 称 スクリップス クリニク アンド リサーチ ファウンデーション
4. 代 理 人
住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 211-8741
氏 名 (5895) 弁理士 中 村 啓
5. 補正命令の日付 平成1年8月22日
6. 補正の対象 明細書及び請求の範囲の翻訳文
図面の翻訳文(第3、9、10、11、12、13、14、16、17図)
7. 補正の内容 別紙のとおり
明細書、請求の範囲の翻訳文及び図面の翻訳文
第3、9、10、11、12、13、14、16、17図の
の浄書。(内容に変更なし)

方 式 ④

1.9.-1
国際

国際調査報告

| | | | |
|--|---|----------------------|----------------------|
| 1. CLASSIFICATION BY SUBJECT MATTER IN SOURCE DOCUMENTS (PCT/US88/00998) | | | |
| IPC (4): C07H 21/04; C12N 15/00; C07K 1/04; 7/06; 7/10; 13/00; 15/00; C01W 33/33; C12P 21/00; 21/02; A61K 39/00; 39/05; C23F 13/12 | | | |
| 2. FIELD CLASSIFICATION | | | |
| Maximum Document Classification | | | |
| Classifications | Classifications | | |
| 424/25; 425/7, 46, 70, 72, 91, 172, 1-172, 3, 243, 253, 260; 514, 2, 6, 12-15, 122; 520, 224-227, 362, 367, 534, 537, 539, 5, 6, 11, 12, 22, 25, 28-106; 436/203 | U.S. | | |
| 3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
| C.A. File: 1967-1988 MOSIS File: 1967-1988 | | | |
| 4. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
| Category | Category of Document | Category of Document | Category of Document |
| Y | A. GUBA ET AL., "Affinity purification of human tissue factor. Interaction of factor VII and tissue factor in detergent micelles". Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Volume 83, pages 289-302, published January 1986 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington, D.C., USA). See entire document. | 1-3a and 42-5d | |
| Y | G.J. BROFF, JR. ET AL., "Purification of human brain tissue factor". The Journal of Biological Chemistry, Volume 260, pages 10917-10920, published 15 September 1985 by the American Society of Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Baltimore, MD, USA). See entire document. | 1-3b and 42-5e | |
| 5. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 6. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 7. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 8. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 9. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 10. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 11. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 12. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 13. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 14. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 15. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 16. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 17. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 18. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 19. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 20. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 21. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 22. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 23. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 24. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 25. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 26. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 27. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 28. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 29. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 30. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 31. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 32. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 33. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 34. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 35. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 36. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 37. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 38. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 39. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 40. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 41. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 42. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 43. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 44. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 45. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 46. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 47. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 48. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 49. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 50. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 51. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 52. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 53. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 54. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 55. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 56. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 57. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 58. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 59. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 60. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 61. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 62. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 63. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 64. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 65. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 66. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 67. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 68. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 69. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 70. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 71. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 72. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 73. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 74. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 75. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 76. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 77. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 78. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 79. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 80. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 81. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 82. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 83. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 84. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 85. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 86. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 87. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 88. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 89. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 90. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 91. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 92. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 93. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 94. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 95. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 96. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 97. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 98. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 99. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |
| 100. SUMMARY OF RELEVANT DOCUMENTS | | | |

| | |
|--|--|
| FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM THE SECOND SHEET | |
| X.P. Y.P. | X.M. SCARPATI ET AL., "Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene". Biochemistry, Volume 26, pages 5234-5238, published 28 August 1987 by the American Chemical Society (Columbus, Ohio USA). See entire document. |
| | 1.11-14 and 17 and 17-19, 16, 1a-3d, and 42-5d |
| X. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSUPPORTABLE | |
| X.1. Claim 39-41. Because they refer to both the international publication and the priority claim, they are not allowable under Article 17(2)(b) of the EPC Convention. | |
| X.2. Claim 39. Because it recites "an antibody composition, according to claim 22" while claim 22 is not directed to an antibody. Claim 40 depends from claim 39. Claim 41 recites a "polypeptide of claim 15" while claim 15 is directed to a DNA. Hence, each of the claims 39-41 is incomplete and unsupportable. | |
| X.3. Claim 40. Because it recites "an antibody composition, according to claim 22" while claim 22 is not directed to an antibody. Claim 40 depends from claim 39. Claim 41 recites a "polypeptide of claim 15" while claim 15 is directed to a DNA. Hence, each of the claims 39-41 is incomplete and unsupportable. | |
| X.4. Claim 41. Because it recites "an antibody composition, according to claim 22" while claim 22 is not directed to an antibody. Claim 41 depends from claim 39. Claim 40 depends from claim 39. Claim 41 recites a "polypeptide of claim 15" while claim 15 is directed to a DNA. Hence, each of the claims 39-41 is incomplete and unsupportable. | |
| X.5. Claim 42. Because it recites "an antibody composition, according to claim 22" while claim 22 is not directed to an antibody. Claim 42 depends from claim 39. Claim 43 depends from claim 39. Claim 44 depends from claim 39. Claim 45 depends from claim 39. Claim 46 depends from claim 39. Claim 47 depends from claim 39. Claim 48 depends from claim 39. Claim 49 depends from claim 39. Claim 50 depends from claim 39. Claim 51 depends from claim 39. Claim 52 depends from claim 39. Claim 53 depends from claim 39. Claim 54 depends from claim 39. Claim 55 depends from claim 39. Claim 56 depends from claim 39. Claim 57 depends from claim 39. Claim 58 depends from claim 39. Claim 59 depends from claim 39. Claim 60 depends from claim 39. Claim 61 depends from claim 39. Claim 62 depends from claim 39. Claim 63 depends from claim 39. Claim 64 depends from claim 39. Claim 65 depends from claim 39. Claim 66 depends from claim 39. Claim 67 depends from claim 39. Claim 68 depends from claim 39. Claim 69 depends from claim 39. Claim 70 depends from claim 39. Claim 71 depends from claim 39. Claim 72 depends from claim 39. Claim 73 depends from claim 39. Claim 74 depends from claim 39. Claim 75 depends from claim 39. Claim 76 depends from claim 39. Claim 77 depends from claim 39. Claim 78 depends from claim 39. Claim 79 depends from claim 39. Claim 80 depends from claim 39. Claim 81 depends from claim 39. Claim 82 depends from claim 39. Claim 83 depends from claim 39. Claim 84 depends from claim 39. Claim 85 depends from claim 39. Claim 86 depends from claim 39. Claim 87 depends from claim 39. Claim 88 depends from claim 39. Claim 89 depends from claim 39. Claim 90 depends from claim 39. Claim 91 depends from claim 39. Claim 92 depends from claim 39. Claim 93 depends from claim 39. Claim 94 depends from claim 39. Claim 95 depends from claim 39. Claim 96 depends from claim 39. Claim 97 depends from claim 39. Claim 98 depends from claim 39. Claim 99 depends from claim 39. Claim 100 depends from claim 39. | |

| | |
|---|---|
| FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM THE SECOND SHEET | |
| X.P. Y.P. | J.M. KITTLES ET AL., "Identification of a cDNA clone for bovine tissue factor". Federation Proceedings, Volume 43, page 1639, abstract no. 927, published May 1985 by The Federation of American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA). See entire document. |
| | 1-3b and 42-5d |
| X.P. Y.P. | E.M. SCARPATI ET AL., "Human tissue factor: cDNA cloning, primary structure, and chromosome localization". Federation Proceedings, Volume 46, page 2242, abstract no. 1846, published 1 May 1987 by The Federation of American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA). See entire document. |
| | 1.11-14 and 17 and 17-19, 16, 1a-3d, and 42-5d |
| X.P. Y.P. | J.H. MORRISSEY ET AL., "Molecular cloning of the cDNA for human tissue factor". Federation Proceedings, Volume 46, page 716, abstract no. 2338, published 1 May 1987 by The Federation of American Societies for Experimental Biology (Bethesda, MD, USA). See entire document. |
| | 1-3b and 42-5d |
| Y | S.D. CARSON ET AL., "Monoclonal antibodies against bovine tissue factor, which block interaction with factor VIIa". Blood, Volume 68, pages 137-138, published July 1985 by the American Society of Hematology, Grune & Stratton, Inc. (Orlando, Fla., USA). See especially pages 137-138. |
| | 1-3b and 42-5d |
| X.P. Y.P. | J.H. MORRISSEY ET AL., "Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade". Cell, Volume 50, pages 129-135, published 3 July 1987 by Cell Press (Cambridge, Mass., USA). See entire document. |
| | 1-3b and 42-5d |

Interpolated document No. PCT/US88/00558

| B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE PREVIOUS SHEET) | | |
|--|---|---|
| Category | Excerpt of Description, or any translation, being abstracted, at the request of the applicant | Excerpt of Claim No. 1 |
| Y | A.H. AEBERSOLD ET AL., "Electroblotting onto activated glass", The Journal of Biological Chemistry, Volume 261, pages 4229-4238, published 25 March 1986 by The American Society of Biological Chemists, Inc., Waverly Press (Baltimore, MD, USA). See especially page 4229. | 21-3a, 42-4a and 51-5a |
| Y, P | Chemical Abstracts, Volume 107, Number 17, issued 26 October 1987 (Columbus, Ohio, USA), S.D. CARSON ET AL., "An inhibitory monoclonal antibody against human tissue factor", see page 539, the Abstract No. 152425h, Blood 1987, 70(2), 490-3(Eng.). | 1-3a and 42-5a |
| Y, P Y, P | Chemical Abstracts, Volume 108, Number 9, issued 29 February 1988 (Columbus, Ohio, USA), K.L. FISHER ET AL., "Cloning and expression of human tissue factor cDNA", see pages 195-196, the Abstract No. 70091c, Thromb. Res. 1987, 48(1), 89-99(Eng.). | 1, 11-14 and 17 2-10, 13-16 18-3a and 42-5a |
| Y | A. KINZEL ET AL., "Transformation of yeast", Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 75, pages 1929-1933, published April 1978 by the National Academy of Sciences of the United States of America (Washington D.C., USA). See especially page 1929. | 1-3a and 42-5a |
| Y | M. HOUGHTON ET AL., "The amino-terminal sequence of human fibroblast interferon as deduced from reverse transcripts obtained using synthetic oligonucleotide primers", Nucleic Acids Research, Volume 8, Number 9, pages 1913-1911, published May 1980 by IRL Press Limited (Oxford, England). See page 1913. | 1-3a and 42-5a |

From PCT 15a, 15b, 15c, 15d, 15e, 15f, 15g, 15h, 15i, 15j, 15k, 15l, 15m, 15n, 15o, 15p, 15q, 15r, 15s, 15t, 15u, 15v, 15w, 15x, 15y, 15z

第1頁の続き

| ⑤Int. Cl. ⁴ | 識別記号 | 庁内整理番号 |
|------------------------|------|-----------|
| C 07 K 7/08 | | 8318-4H |
| | | 8318-4H |
| | | 8318-4H |
| C 12 N 5/00 | | B-8515-4B |
| C 12 P 21/02 | | 6712-4B |
| G 01 N 33/53 | | D-7906-2G |
| | | L-7906-2G |
| | | B-7906-2G |
| 33/577 | | |
| /(C 12 P 21/02 | | |
| C 12 R 1:91 | | |
| C 07 K 99:00 | | |

優先権主張 ⑨1987年6月25日⑨米国(US)⑨067,103

⑨1988年3月9日⑨米国(US)⑨165,939

⑨発明者 モーリジー ジェイムズ エイ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン ディエゴ カ
チ ミノ キオスコ 7955

特許法第17条第1項又は第17条の2の規定
による補正の掲載

昭和63年特許願第503555号(特表平 1-
503438号、平成 1年11月22日発行公表特許
公報)については特許法第17条第1項又は第17条の2
の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。

| Int.Cl. ⁸ | 識別 記号 | 庁内整理番号 |
|----------------------|----------|-----------|
| C12N 15/09 | ZNA | |
| C07K 7/06 | | 8318-4H |
| 7/08 | | 8318-4H |
| 14/435 | | 8318-4H |
| 16/18 | | 8318-4H |
| C12N 5/10 | | |
| C12P 21/02 | | C-9282-4B |
| 21/08 | | 9161-4B |
| // A81K 39/396 | | N-9284-4C |
| G01N 33/53 | | L-7055-2J |
| | | D-7055-2J |
| 33/577 | | 7055-2J |

(続きあり)

手 続 補 正 書

1. 3. 28
平成 年 月 日

特許庁長官 高 島 東 殿

1. 事件の表示 昭和63年特許願第503555号

2. 発明の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA断片・
ポリペプチド及び抗体

3. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 スクリップス・クリニック・アンド・リサーチ
ファウンデーション

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号

電話(代) 3211-8741

氏 名 (5895) 弁護士 中 村 隆

5. 補正命令の日付 日 月 年

6. (本補正により請求の範囲に記載された請求項の数は合計「51」
となりました。)

7. 補正の対象 明細書および請求の範囲の欄

8. 補正の内容

方 印

3.29

日 印

平成 7. 12. 20 発行

| Int.Cl. ⁸ | 識別 記号 | 庁内整理番号 |
|----------------------|----------|-----------------|
| | | A-9281-4B |
| | | C12N 15/00 -ZNA |
| | | B-7729-4B |
| | | C12N 5/00 |

1. 請求の範囲を別紙の通り補正する。
2. 明細書84頁7行の「BLOTTU」の後、「PBSにおける、5% w/v 非脂肪乾燥ミルク、0.01%アンチフォームA(シグマ製)、及び0.0001%マーチオレート(merthiolate)」を挿入する。
3. 同88頁13~14行の「TF8-5G8.....TF8-5G9」を「TF8-5G9、TF8-5G8及びTF8-5G9」と補正する。
4. 同89頁18行の「8a」を「2A」と補正する。
5. 同89頁20行の「6」を「2A」と補正する。
6. 同70頁9行の「TF8-589」を「TF8-5G9」と補正する。

(3) 上記構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(2)記載のDNA断片。

請求の範囲

- (1) ヒトの組織因子重複タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する配列を含む、わずか12,000ヌクレオチド塩基対を含むDNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。

| | | | |
|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 |
| SGTTNTVAAY | NLTWKSTNFK | TILEWEPKV | NQVYTVQIST |
| 50 | 60 | 70 | 80 |
| XSGDWKSKCF | YTTDTECDLT | DEIVKDVQKT | YLARVFSYPA |
| 90 | 100 | 110 | 120 |
| GNVESTGSAG | EPLYENSPEF | TPYLETNLGQ | PTIQSFEQVG |
| 130 | 140 | 150 | 160 |
| TKVNVTVDE | RTLVRNRNTP | LSLRDVPKGD | LIYTLYYWXS |
| 170 | 180 | 190 | 200 |
| SSSGRKTAKT | NTNEFLIDVD | XGENYCPSVQ | AVIPSRTVBR |
| 210 | 220 | 230 | 240 |
| KETDSPVECH | GQEKGEFREI | PYIIGAVVVF | VIIILVILAI |
| 250 | 260 | | |
| SLHKCRKAGV | GQSWKENSPL | NVS | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| N | T | L | S | L | R | D | V | P | Q | K | D | L | I | Y | T | L | Y | V | U | K | S | S | S | C | K | N | Y |
| A | C | A | C | T | T | L | A | C | C | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T |
| 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | |
| A | K | T | V | N | E | F | L | I | D | V | D | K | E | N | Y | C | F | S | V | Q | A | V | I | P | S | R | T |
| T | C | C | A | A | C | A | C | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | |
| 800 | 810 | 820 | 830 | 840 | 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 | 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | |
| V | N | K | S | T | D | S | P | V | E | C | H | C | Q | E | K | E | F | R | E | I | F | Y | I | I | C | A | V |
| T | T | A | C | C | C | A | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | |
| 1070 | 1080 | 1090 | 1100 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 | 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 | 1310 | 1320 | 1330 | |
| V | F | V | I | L | V | I | L | I | L | A | S | L | H | K | C | R | K | A | G | V | C | S | V | K | E | N | |
| T | A | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | | |
| 1340 | 1350 | 1360 | 1370 | 1380 | 1390 | 1400 | 1410 | 1420 | 1430 | 1440 | 1450 | 1460 | 1470 | 1480 | 1490 | 1500 | 1510 | 1520 | 1530 | 1540 | 1550 | 1560 | 1570 | 1580 | 1590 | 1600 | |
| S | P | L | N | Y | S | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T | C | C | C | C | C | T | A | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | | |
| 910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 | 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|---|---|---|---|---|---|
| S | C | T | H | Z | V | A | Y | M | L | T | V | K | S | T |
| 120 | 140 | 130 | 160 | 170 | 180 | | | | | | | | | |
| N | F | K | I | L | Z | U | P | K | P | V | N | Q | V | Y |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270. | | | | | | |
| K | C | F | Y | T | D | E | C | D | L | T | D | E | I | V |
| 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | | | | | | |
| Y | P | A | C | N | V | E | S | T | G | S | A | G | E | F |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | | | | | | |
| L | C | Q | P | T | I | Q | S | P | K | Q | V | O | T | K |
| 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | | | | | | |

- (4) 上記構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有する可溶性ヒト組織因子重鎖タンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。

| | | | |
|------------|------------|------------|------------|
| SGTTNTVAAY | NLTWKSTNFK | TILEWEPKPV | NQVTVQIST |
| KSGDWKSKCF | YTTDTECDLT | DEIVXDVKQT | YLARVFSYPA |
| GNVESTGSAG | EPLYENSPEP | TPYLETNLQ | PTIQSFEQV |
| TKVNVTVDE | RTLVRNRNTP | LSLRDVPKQ | LIYTLYYKS |
| SSSGKKTAKT | NTNEPLIDVD | XGENYCPSVQ | AVIPSATVNR |
| KSTDSPVECH | GQEKGEFRE | | |

発行

(5) 上記構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(4)記載のDNA断片。

[illegible]

(8) 上記配列(第1の配列)の5'末端に連続し、かつ上記タンパク質のアミノ末端に結合した、アミノ酸残基リーグ配列をコードする第2の配列も含み、かつ該第1及び第2のDNA配列がヒト組織因子重鎖前駆体タンパク質をコードする遺伝子構造子を規定する、請求の範囲(1)記載のDNA断片。

(7) 上記混成構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(8)記載のDNA断片。

| | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 |
| SGTTNVAAY | NLTWKSTNFK | TILEWEPKPV | NQVYTVQIST |
| 50 | 60 | 70 | 80 |
| KSGDWKSKCF | YTTDTECOLT | DEIVKDVKQT | YLARVFSYPA |
| 90 | 100 | 110 | 120 |
| GRVESTGSAG | EPLYENSPEF | TPYLETNLQG | PTIQSFQVVG |
| 130 | 140 | 150 | 160 |
| TKVNVTVEDF | RTLVRNNWTF | LSLRDVFQKD | LIYTLTYWKS |
| 170 | 180 | 190 | 200 |
| SSGCKKTAKT | NTNEFLIDVD | KGENYCPSVQ | AVIPSRTVNR |
| 210 | 220 | 230 | 240 |
| KSTDSPVECH | GQEKGEFREI | PYIIGAVVFW | VIIIVIIILAI |
| 250 | 260 | | |
| SLHKCKRIAGV | GQSWKENSPL | NVS | |

(8) 上記構成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲
(7) 記載のDNA断片。

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N | E | T | A | V | P | R | V | P | R | P | E | T | A | V | A | R | T |
| 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | | | | | | | | | | | | |
| L | L | G | V | V | F | A | Q | A | G | A | G | A | G | A | G | A | G |
| 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | | | | | | | | | |
| C | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C | T | C | T |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | | | | | | | | | |
| N | F | K | T | I | L | E | Z | E | P | K | P | V | N | Q | V | Y | V |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | | | | | | | | | |
| A | N | T | T | G | A | G | A | M | T | T | T | T | T | T | T | T | T |
| 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | | | | | | | | | |
| K | C | F | Y | T | D | T | E | C | D | L | T | D | E | I | V | K | D |
| 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | | | | | | | | | |
| A | M | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | | | | | | | | | |
| Y | P | A | C | N | V | E | S | T | G | S | A | C | E | P | L | Y | E |
| 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | | | | | | | | | |
| T | A | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | | | | | | | | | |
| L | C | Q | P | T | I | Q | S | F | E | Q | V | C | T | K | N | V | T |
| 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | | | | | | | | | |
| T | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 | | | | | | | | | |

(9) 上記混成構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有する、可溶性ヒト組織因子重鎖タンパク質前駆体をコードする、請求の範囲(8)記載のDNA断片。

[illegible]

| | -30 | -20 | -10 |
|------------|------------|------------|------------|
| ME | TPAWPRVPRP | ETAVARTILL | GWVPAQVAGA |
| 10 | 20 | 30 | 40 |
| SGTTNTVAAY | NLTWKSTNPK | TILEWEPKPV | HQVYTVQIST |
| 50 | 60 | 70 | 80 |
| KSGDWKSKCP | YTTDTECDLT | DEIVKDVXQT | YLARVPSYPA |
| 90 | 100 | 110 | 120 |
| GNVESTGSAG | EPLYENSPEF | TFYLETNLQ | PTIQSFEQVG |
| 130 | 140 | 150 | 160 |
| TKVNVTVDEE | RTLVRNRNTP | LSLRDVPKGD | LIYTLXYWIS |
| 170 | 180 | 190 | 200 |
| SSSGKXTAKT | NTNEFLIDVD | KGENYCFSVQ | AVIPSRTVMR |
| 210 | | | |
| XSTDSPVECM | GQEXGEPRE | | |

(10)上記混成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲
(9)記載のDNA断片。

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---|-----|---|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|----|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|---|
| N | E | T | P | A | V | P | R | V | P | R | P | E | T | A | V | A | R | T | | | | | | | | | | | |
| 40 | | | | 30 | | | | 60 | | | 70 | | | | | 80 | | | | | | | | | | | | | |
| ATGACGACCGCTGTCCGCGCCGCGACGACCGCGCTGTCCGACG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L | L | L | C | V | V | P | A | Q | V | A | G | A | S | C | T | T | N | T | V | A | A | Y | M | L | Y | V | K | S | T |
| 100 | | | | 110 | | | | 120 | | | 130 | | | 140 | | | 150 | | | 160 | | | 170 | | | 180 | | | |
| CTCTGCTCGCTGGCTTTTGGCGGCGCGCGCTGTACGCGATGCTGTCCGACGATATATTAATTCGTGCAATCACT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N | F | K | T | I | L | E | V | E | P | K | P | V | N | Q | V | Y | T | Q | I | S | T | K | S | C | D | Y | K | S | |
| 190 | | | | 200 | | | | 210 | | | 220 | | | 230 | | | 240 | | | 250 | | | 260 | | | 270 | | | |
| AMTTTCAGACGATTTTTCAGTTCGCAACCGCTCATCTAGCTGTTCGATATGACGCTGACTGCGACGATTCGACGAC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| K | C | F | Y | T | T | D | T | E | C | D | L | T | D | E | I | V | K | D | Y | K | Q | T | Y | L | A | R | V | F | S |
| 280 | | | | 290 | | | | 300 | | | 310 | | | 320 | | | 330 | | | 340 | | | 350 | | | 360 | | | |
| AAATGTTTTCAGACGACGACGACGCTGCGCTGCGCGACGATGTGTAAGCATCTGACGACGACTGACTGCGACGCGTGTCTGC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | P | A | C | N | V | E | S | T | C | S | A | C | E | P | L | Y | E | N | S | P | E | F | T | P | Y | L | E | T | N |
| 370 | | | | 380 | | | | 390 | | | 400 | | | 410 | | | 420 | | | 430 | | | 440 | | | 450 | | | |
| TACCGCGCAGCGAATGTGACGACGACCGGTTCTCTCGCGACGCTGTGTATGAGATCGCGACGCTGTCGACTTCTGACGACGAC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L | C | Q | P | T | I | Q | S | F | E | Q | V | C | T | K | V | N | V | T | V | E | D | E | R | T | L | V | R | R | N |
| 460 | | | | 470 | | | | 480 | | | 490 | | | 500 | | | 510 | | | 520 | | | 530 | | | 540 | | | |
| CTTCGACGACGACGATTCAGATGTTTCAGACGCTGCGACAAAGTCAATGCTGCGCTAGACGATGAAAGCGATTTTACTGTCAGACGAC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

M T F L S L R D V F G K D L I Y T L Y Y W K S S S G K K T
 350 350 370 380 390 600 610 620 630
 A X T M T N E F L I D V D K C E N Y G F S V Q A V I P S R T
 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 V N R K S T D S P V E C M G Q E K G E F R E
 730 740 750 760 770 780

平成 7.12.20 発行

- (11) ヒト組織因子産生タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する第1のDNA断片に特異的に結合したベクターを含む組換えDNA分子。
 (12) 上記構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする。請求の範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。

```

      10      20      30      40
SGTTNTVAAY NLTKWSTNPK TILEWEKPKV NQVYTVQIST

      50      60      70      80
KSGDWKSKCF YTTDTTECOLT DEIVKDVQKT YLARVPFSYPA

      90     100     110     120
GNVESTGSAG EPLYENSPEP TPYLETNLQQ PTIQSPSEQVG

     130     140     150     160
TKVNVTVDEE RTLVRRNNTF LSLRDVPCKD LIYTLYYWKS

     170     180     190     200
SSSGKXTAKT NTNEFLIDVD KGENYCFSVQ AVIPSRVTNR

     210     220     230     240
KSTDSPVECH GQEKGEPREI FYIIGAVVFF VIIIVILAI

     250     260
SLHKCRXAGV GQSHKENSPL NVS
  
```

```

N T F L S L A D V P G K D L I Y T L Y Y V K E S S C R K T
A G A T T T C T A G C G T G G A G T T T T G C A G C A G T T A T T A T T G C A A T T T C A G C A G T T C A C C A A A A A A
550 560 570 580 590 600 610 620 630

A K T N T H E F L I D V D E G E N Y C F S V Q A V I F S R T
G C C A A A C A G A G T A G T A G T T T T T A T T G A T T G A T T A G C A A A A G T A G T T T C A G C A G T T A T T C T C C A C A
640 650 660 670 680 690 700 710 720

V N R K S T D S P V S C N G Q E K G E P R E I F Y I I C A V
G T T A C C G A A G A G T A C A G A C C C G T A G T T A T T G C C A G C A A G C G A T T C A C A A A T T T T C A C A T T T G C A G C T G
730 740 750 760 770 780 790 800 810

V F V V I I L V I I L A I S L H K C R K A G V G Q S V K E N
G T A T T T C T G T A G T T G A T C A G C T C T C T A T T C T C A C A G T T A G A A G C A G C A G T T G C C A G C A G C A G C A G
820 830 840 850 860 870 880 890 900

S P L N V S
T C C C A C T A A T T T T C A
910
  
```

- (13) 上記構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する。請求の範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。

```

S G T T N T V A A Y N L Y V K S T
T C A G C A G T A G T T G C A G C A T A T T A T T A G T T C A A T C A C T
130 140 150 160 170 180

N F K T I L E U E P K P V M Q V Y T V Q I S T K S G D V K S
A A T T C A G C A G T T T G C A G C A G C C C G T C A T C A G T T T C A A T A G C C A T T A G C A G C A T T C A A A G C
190 200 210 220 230 240 250 260 270

K C F Y T T D T E C D L T D E I V K D Y K Q T Y L A R V F S
A A Y G C T T T T A C A C A C A C A G A G T G T C A C C A G A G T T T A G A G A G T T A G C A G C C G T T T T C C
280 290 300 310 320 330 340 350 360

Y F A G N V E S T G S A G E P L Y E M S P E P T P Y L P L T N
T A C C C C A C C A A T T G C A G C A G C C C T T T G T G C A G C C T T A T T A G A G A G T C C C A G A G T T C A G C T T A G C A G A A G
370 380 390 400 410 420 430 440 450

L G Q P T I L Q H F H Q V G C T K V H V T V E D E R T L V R R N
C T C C A G C C A G A A T T C A G C A G T T T T T C A G A G T T G A A A A A G T A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G A G
460 470 480 490 500 510 520 530 540 550
  
```

- (14) さらに、上記第1の断片の5'末端に連続し、かつ上記タンパク質に結合した、アミノ酸残基リーダー配列をコードし、かつ該第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする混成構造遺伝子を規定する。請求の範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。
 (15) 上記混成構造遺伝子が、以下のアミノ酸残基配列に対応するアミノ酸残基配列を有する。上記タンパク質の前駆体をコードする。請求の範囲 (11) 記載の組換えDNA分子。

(18) 上記誤成構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列に対応するヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲 (15) 記載の組換え DNA 分子。

| | | | |
|------------|------------|------------|-------------|
| | -30 | -20 | -10 |
| ME | TPAWFRVFRP | ETAVARTLLL | GHVPAQVAGA |
| 10 | 20 | 30 | 40 |
| SGTTNTVAAY | NLTWKSTNFK | TILEWEPKPV | NQVYTVQIST |
| 50 | 60 | 70 | 80 |
| XSGDWKSKCP | YTTDTECDLT | DEIVKDVXQT | YLARVFSYPA |
| 90 | 100 | 110 | 120 |
| GNVESTGSAG | EPLYENSPEP | TPYLETNLQG | PTIQSFQVGC |
| 130 | 140 | 150 | 160 |
| TKVNVTVDE | RTLVRNRNTP | LSLRDVPKGD | LIYTLYYWKS |
| 170 | 180 | 190 | 200 |
| SSSGKXTAKT | NTNEFLIDVD | XGENYCPVSQ | AVIPSRTVNR |
| 210 | 220 | 230 | 240 |
| KSTDSPVECH | GQEKGEFREI | FYIIGAVVTV | VIIIVIIILAI |
| 250 | 260 | | |
| SLHKCRKAGV | GQSWKENSPL | NVS | |

[illegible][illegible]

(17) 上記ベクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を指揮しうる、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。

(11) 記載の組換えDNA分子。

(19)上記ベクターが、宿主細胞中、上記前駆体タンパク質を発現しうる、請求の範囲(14)記載の組換えDNA分子。

(20) 上記ベクターが、pKSV-10であり、かつ、上記融合構造遺伝子が、可溶性の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、以下のヌクレオチド配列を有する、請求の範囲(19)記載の組換えDNA分子。

[illegible]

-VNQVYTVQIST-, &U
-LYTWKSSSSGKXT -

(22) 上記ポリペプチドが、式：

で表われる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド類似物。

$$H-\text{LYYKSSSSGKET}-OH$$

で表われる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド類似物。

H-VPGKDLIYTLVYWKSSSSSEKKT-OH, & U

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類似物。

H-SGTTNTVAAIYNLTWKSTNFKTILEWEPKPV-OH,
H-TKSGDWHKSKCFTTDTDECOLDTDEIVKDVQKTY-OH,
H-KSGDWHKSKC-OH,
H-ECOLDTDEIVKDVQKTY-OH,
H-LARVTSYPAGNVESTGSGAPTEIYENSFEFTPYLC-OH,
H-YENSFEFTPYLTLENLGDSQPTIQSFQVGTKV-OH, RU
H-QAVIPSRVTNNRSTGSPVEC-OH.

(26)a) ヒト組織因子産生タンパク質と免疫反応し、

H-EFKPVNQVITVQISTKSGDMKSKC-OH,
H-VFQKDLITLTKTNSSESGKKT-OH,
H-SSGKKLTXTNTNFIIDVDRGENYCFSV-OH,
H-SGITNTVAAYNLWSTNFTKILEWEPKPV-OH,
H-TISGDWMSKCFYTTDTECDLTUEIYNDVKQTY-OH,
H-KSGDMWMSKC-OH,
H-ECDLTUEIYNDVKQTY-OH,
H-LARVSYIPAGNVSTSGSACEPLYNSTPFTTYLC-OH,
H-YENSYSTPFTTYLNLGQPTTSFEQVTKY-OH, *Asu*
H-QAVISRTWNRKSTDSFPEC-OH, *Asu*.

抗体分子を含む、抗体組成物。

(27)上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲(28)記載の組成物。

(28)上記抗体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、請求の範囲 (28)記載の組成物。

(29) ヒト組織因子重鎖タンパク質及び配列: EPKPV NQYTVQIST KSGDKSKC
で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する。TP8-5G
と命名されたハイブリドマ。

(30) 請求の範囲 (29) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

(31) ヒト組織因子産生タンパク質及び配列: EPKPV NQVYTVQIST KSGDNKSKC
で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-10
H10と命名された、ハイブリドーマ。

(32)請求の範囲(31)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

(33) ヒト組織因子重鎖タンパク質及び配列: VFQKD LIYTLYYNKS SSSCKXT で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF 9-8 B4 と命名したハイブリドーマ。

平成 7.12.20 発行

(34)請求の範囲(33)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

(35)a) 身体サンプルを、ヒト組織因子重鎖タンパク質と混合し、免疫反応混合物を作る；

b) この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な時間維持する、そして、

c) ステップb)で生成した免疫反応産物の存在を決定する、

以上a)～c)のステップを含む、体液サンプル中のヒト組織因子重鎖タンパク質の存在を決定する方法。

(36)a) 請求の範囲(22)記載の抗体組成物を含有するパッケージを含むサンプル中に存在するヒト組織因子重鎖タンパク質の存在を決定するための、キットの形をした診断システム。

(37)上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、

a) TFP-5GB、

b) TFP-8B4、

c) TFP-10H10

からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生される、請求の範囲(36)記載の診断システム。

(38)a) サンプルを、請求の範囲(15)記載のポリペプチドを固体マトリックスに固定した固体サポートと混合して、結合反応混合物を形成する、

b) 上記結合反応混合物を、凝固因子が上記ポリペプチドと結合し、固相複合体及び上清を形成するのに十分な時間維持する、

c) 上記複合体から上記上清を分離する、及び

d) ステップc)の分離した複合体から、上記凝固因子を回収する、

以上、a)～d)のステップを含む、サンプルから血液凝固因子VII/VIIaを分離する方法。

(39)実質的に、ヒト組織因子軽鎖タンパク質を含まない生理学的活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質の水溶液を含む組成物。

(40)上記生物学的活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質を、リン脂質中に分散

(43)a)少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子軽鎖タンパク質を含まない、生物学的活性のあるヒト組織因子重鎖タンパク質の水溶液を含有する組成物を含むパッケージ、

を含む血管システム液体サンプル中での凝固能を決定するキットの形をした診断システム。

(44)上記重鎖タンパク質がリン脂質中に分散している、請求の範囲(43)記載の診断システム。

(45)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、以下のアミノ酸残基配列を有する、請求の範囲(43)記載の診断システム。

10 20 30 40
SGTTNTVAAY NLTKSTNFK TILEWEKPKV NQYTVQIST

50 60 70 80
KSGDWKSKCF YTTDTECDLT DEIVKDVKQT YLARVPSYPA

90 100 110 120
GNVESTGSAG EPLYENSPEF TPYLETNLQ PTIQSFEQVC

130 140 150 160
TKVNVTVDEE RTLVRNNTF LSLRDVFGKD LIYTLYYNKS

170 180 190 200
SSSGKKTAKT NTNEFLIDVD KGENYCPFSVQ AVIPSRVTNR

210
KSTDSPVECH GQKXGEFRE

させた、請求の範囲(39)記載の組成物。

(41)上記溶液が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲(39)記載の組成物。

(42)上記タンパク質が可溶性であり、かつ、以下のアミノ酸残基配列を有する、請求の範囲(39)記載の組成物。

10 20 30 40
SGTTNTVAAY NLTKSTNFK TILEWEKPKV NQYTVQIST

50 60 70 80
KSGDWKSKCF YTTDTECDLT DEIVKDVKQT YLARVPSYPA

90 100 110 120
GNVESTGSAG EPLYENSPEF TPYLETNLQ PTIQSFEQVC

130 140 150 160
TKVNVTVDEE RTLVRNNTF LSLRDVFGKD LIYTLYYNKS

170 180 190 200
SSSGKKTAKT NTNEFLIDVD KGENYCPFSVQ AVIPSRVTNR

210
KSTDSPVECH GQKXGEFRE

(46)a)ヒト組織因子重鎖タンパク質をコードする構造遺伝子を規定する第1のDNA断片及び、第1のDNA断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ酸残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片で、該第1及び第2のDNA断片合せて上記タンパク質の前駆体をコードする遺伝子構造遺伝子を規定しているDNA断片と機能的に結合する、ホ乳頭細胞に適合する発現ベクターを含む組換えDNA分子でトランスフォームしたホ乳頭細胞の培養地での培養を開始する；

b)上記培養物を上記細胞が上記組換えDNA分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する、そして

c)上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する、

以上、a)～c)のステップを含む、成熟ヒト組織因子重鎖タンパク質の調製方法。

(47)上記遺伝子構造遺伝子が、以下のヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(46)記載の方法。

平成 7.12.20 発行

手 続 補 正 書 (方式)

平成 7. 3. 28 月 日

特許庁長官 職

1. 事件の表示 昭和33年特許願第503555号
(PCT/USA8/00888)

2. 発明の名称 ヒトの組織因子に関連するDNA断片・ポリペプチド及び抗体

2. 増圧をするが

事件との関係

形 理 人

名 称 スクリップス クリニック アンド リサーチ
ファウンデーション

4代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 3211-8741

氏 名 (5895) 井理士 中 村

5.補正命令の日付 平成1年8月22日

6. 補正の対象 明細書および請求の範囲の翻訳文
図面の翻訳文（第3、9、10、11、12、13、14、16、17図）

7. 補正の内容 原紙のとおり

明細書、請求の範囲および図面の解説文（第 3、9、10、11、13、14、16、17 図）の修正（内容に変更なし）

方式 (煙)

特許庁
7.3.29
支店 保
受付

明 細 書

ヒトの組織因子に関連する DNA 断片・
ポリペプチド及び抗体

(本出願の関連文献)

本出願は、1987年3月31日に出版された米国出版第
033,047号及び1987年6月25日に出版された出版第
067,103号の部分継続出願である。

(技術分野)

本発明は、ヒトの組織因子重鎖タンパク質 (h u T F h) をコ
ードする構造遺伝子を有する組換え DNA 分子 (r DNA) に関
し、より詳細には、本発明は、宿主細胞に含まれる、h u T F h
を発現しうる発現ベクターに関するものである。また、本発明は
h u T F h の合成ポリペプチド類似物及び h u T F h 及び該ポリ
ペプチド類似物と結合するモノクローナル抗体に関する。

(発明の背景)

凝血は、一群の凝集因子として知られる細胞性及び血漿性タン
パク質によって仲介される。一連の、酵素、共因子、タンパク質
分解及びゲル化反応のカスケードによって起こる。このカスケ
ードの開始は、組織因子 (T F) として知られる細胞性レセプター
が、凝集因子Ⅲ又はその誘導体、因子Ⅴと結合し、触媒的に活
性のある複合体を形成したときに起こる。T F の非存在下、及び
複合体への連続する結合がない場合には、Ⅲ/Ⅴは凝集を開始
しない。従って、T F の化学的かつ生化学的特性が、凝集のメカ
ニズムを理解する上で重要なことは明白である。

組織因子は、通常循環系中で可溶性しておらず、また、因子Ⅴ
/Ⅴ_a 及び他の凝集因子を含む血漿タンパク質と接触できないこ
とが分っている。膜に結合した糖タンパク質である。組織因子は

混合物の界面活性剤及びイオン組成に影響されると報告されてい
る。ネマソン (Nemerson)、ジャーナル・オブ・クリニカル・
インベスティゲーション (J. Clin. Invest.) 47-72頁 (1968) ;
ネマソン (Nemerson)、ジャーナル・オブ・クリニカル・イン
ベスティゲーション (J. Clin. Invest.) 48-322頁 (1969年)
及びカーソン (Carson) 等、サイエンス (Science)、208巻、
307頁 (1980年) 参照。

単離した、もしくは、再脂質化した T F 含有タンパク質製剤
は、数々の種の組織から抽出物によって調製した。組織因子は、
天然の組織中に非常に少量しか存在しないので、歴史的に使用さ
れてきた方法は、困難で、時間もかかり、かつ低収率であった。
古典的方法のレビューとしては、ネマソン (Nemerson) 等の
報告 (プログレス・イン・ヘマトシス・アンド・トロンボシス
(Prog. Hem. Thromb.)) 6巻、237-261頁 (1982年)
を参照せよ。

最近、ブローズ (Broze) 等 (ジャーナル・オブ・バイオリ
カル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)) 260巻、10917-
20 (1985年) ; ボム (Bom) 等 (トロンボリサーチ
(Thromb. Res.)) 42巻、635-643頁 (1986年) 及び
グハ (Guba) 等 (プロシーディング・イン・ナショナル・アカデ
ミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.)) USA 83
巻、299-302頁 (1986年) は、脂質質化組織因子タ
ンパク質を、非イオン性界面活性剤及び C a C l 2 を含む水溶性
溶液に溶かした時、糖タンパク質が因子Ⅴ/Ⅴ_a と結合するとい
う発見に基づいた方法を用いて、ヒトの組織因子 (h u T F) タンパク
質を単離したことを報告している。しかし、組織因子タンパク質
を単離する手段として、因子Ⅴ/Ⅴ_a 親和性吸着体を用いる。これ

通常、血管を形成している細胞の表面上には発現されていないが、
血管中の単球によるその発現は、バクテリアのリボ多糖のような
感染性抗原成分、ある抗原により刺激された T ヘルパー細胞から
誘導され、直接的にはある刺激された T ヘルパー細胞由来のリン
ホカイン及び免疫複合体によって誘導することができる。例えば
バクテリアのリボ多糖同様、インターロイキン 1 及び腫瘍壊死因
子アルファのような単細胞/マクロファージのある炎症性細胞は
血球の体膜側面に T F を発現する内皮細胞を刺激することがで
きる。典型的に、血管要素における T F の発現は、拡大する血管
内凝血又は、局所的な凝血の開始、すなわち血栓形成を起こす。

組織因子は、試験管内の組織芽細胞を含む培養物中のある血管
外細胞、未定型の脂肪細胞及び基底膜ペリヤーにより、阻害する
血漿タンパク質から分離されている上皮細胞の表面上に構成的に
発現される。これら細胞上の T F の存在は、組織損傷の結果とし
ての血液との接触でクロットを形成する。従って、T F は、凝血
システムが開始する基盤である。

ハウエル (Howell) (アメリカン・ジャーナル・オブ・フィ
ジオロジー (Am. J. Physiol.)) 311巻1頁 (1912年) の報
告は、T F を含む単離した組織タンパク質製剤は、リン脂質-
タンパク質 (リボタンパク質) 複合体として存在するときのみ凝
集を促進することができることを示す最初の報告である。典型的
に、T F 含有組織タンパク質の単離が、通常 T F タンパク質と合
合しているリン脂質を除去してしまうので、単離したタンパク質
を再脂質化することによる T F の機能的プロコアグulant 活性の
再構成が必要であることから、これら再構成の研究が多くの研究
者によって行われてきている。例えば、凝集活性の回復は、リン
脂質のタイプ、タンパク質に対するリン脂質の比、及び再構成

ら方法の使用は、有意量の単離Ⅴ/Ⅴ_a を入手することの困難性
のみならず、因子Ⅴ/Ⅴ_a の不安定性によっても制限される。

ブローズ等 (上記) は、h u T F に特異的なモノクローナル抗
体の開発及び免疫親和性吸着体としてのそれらの使用は、因子Ⅴ
/Ⅴ_a 使用の制限によって起こる問題を回避できることを指差し
ている。しかし、抗-h u T F モノクローナル抗体は、該文献中
には報告されていない。さらに、子牛の T F によって生じる 2 つ
のモノクローナル抗体 (カーソン (Carson) 等、ブラッド (Blood),
662巻156頁 (1985年)) は、h u T F とは免疫反応を
起こさない (グハ (Guba) 等、上記)。

(本発明の概要)

1つの態様において、本発明は、ヒトの組織因子重鎖 (h u T F h)
タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わず
か約 12,000 塩基対を含む DNA 断片を考案している。該構造
遺伝子が、第1図の約1番から約263番で示されているアミノ
酸残基を有するタンパク質をコードしていることが好ましい。さら
に、該構造遺伝子は、第2図の約130番から、約918番で
示されるヌクレオチド塩基配列を有することが好ましい。

望ましい態様においては、その DNA 断片は、第1の配列の
5' 末端と連続し、かつ、h u T F h タンパク質のアミノ末端に
結合したアミノ酸残基リーガー配列をコードする第2の配列をも
含む。その第1及び第2の DNA 配列は一緒になって、ヒトの組
織因子重鎖前駆体 (プレ h u T F h) タンパク質をコードする混
成構造遺伝子を定義している。該混成構造遺伝子は第1図の約
32番から約263番で示されるアミノ酸残基を有するタンパク
質をコードしていることが好ましい。さらに、該混成構造遺伝子
は、第2図の約34番から約918番のヌクレオチド塩基配列を

有することが望ましい。

別の態様において、本発明は、ヒトの組織因子重鎖タンパク質をコードする1つの構造遺伝子を定義する第1のDNA断片と組織的に結合したペプターを含む組換えDNA分子を考案している。さらに該組換えDNA分子は、第1の断片の5'末端に連続し、上記タンパク質に結合するアミノ酸残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片を含むことが好ましい。すなわち、上記の第1及び第2のDNA断片は一種になって、上記タンパク質の前駆体をコードする遺伝子構造遺伝子を定義している。

別の態様において、本発明は、わずかに約50アミノ酸残基を含み、かつ

-VNQVYT-

で表わされる配列に相当するアミノ酸残基配列を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考案している。

さらに好ましくは、本発明はわずかに約50アミノ酸残基を含み、かつ、

-VNGVTVQIST-,_{BD}

-LYNKSSSGKKT-

からなる群から選択される式で表わされる配列に相当するアミノ酸残基を含むヒトの組織因子結合部位のポリペプチド類似物を考案している。

さらに本発明の態様には、

a) ヒトの組織因子重鎖タンパク質と免疫反応する、

b) H-EWEPKPVNQVYT-OH,
H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDNKSKC-OH,
H-VFGKDLIYTLTYNKSSSGKKT-OH,
H-RDVFGKDLIYTLTYNKS-OH
H-IYTLTYNKSSSGKKTAK-OH,
H-SSGKKTAKTNTNTEFLIDVDNGENYCFVS-OH,

また、本発明は、

a) 生理学的に許容される希釈剤及び効果的な生体内指示手段と結合させたハイブリドーマTF9-10H10によって作られたある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者に静脈注射により投与し、血中に存在するヒトの組織因子と免疫反応させる、
b) 該抗体分子が、血柱の一部として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、かつ、免疫反応物質を形成するのに十分な時間、その投与を受けた被検者を維持する、
c) ステップb) で生成した免疫反応生成物の存在を検定する、
以上a) ~ c) のステップを含む、生体内で血柱を検出する方法も考案した。

さらに、本発明は、TF9-5G9及びTF9-5B4からなる群から選択されるハイブリドーマにより生産され、存在するヒトの組織因子と効率よく結合する、ある量の抗体分子を含む生理学的に許容される希釈剤を含有するモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈注射により投与することを含む、生体内で、凝集因子Ⅴ/Ⅴaと結合するヒトの組織因子の能力を中和する方法も考案している。

また、本発明は、因子Ⅴ/Ⅴaと反応するのに有効な量の、

H-EWEPKPVNQVYT-OH,
H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDNKSKC-OH,
H-VFGKDLIYTLTYNKSSSGKKT-OH,
H-RDVFGKDLIYTLTYNKS-OH
H-IYTLTYNKSSSGKKTAK-OH, _{BD}
H-SSGKKTAKTNTNTEFLIDVDNGENYCFVS-OH;

からなる群から選ばれるポリペプチドを含む生理学的に許容され

H-SGTHTVAAYHLTKSTHFKTILENPKPV-OH,
H-TKSGDNKSKCFYITDTECDLTDIIVKQVQTY-OH,
H-KSGDNKSKC-OH,
H-ECDLTDIIVKQVQTY-OH,
H-LARVTSYPAGHVESTGSAGEPLYENSPEFIPYLC-OH,
H-YENSPEFTTPVLETHLGGPTIQSFQVGTQV-OH, _{BD}
H-QAVIPSTVVRKSTDSFVEC-OH; _{BD}

からなる群から選択される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する、

c) 実質的に第1図の部位204から部位225で示される式で表わされるポリペプチドとは免疫反応しない、

抗体分子を含む抗体組成物である。

また、本発明は、ハイブリドーマTF9-5G9、TF9-10H10、TF9-5B7及びTF9-5B4と、それらハイブリドーマによって生成される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を考案している。

本発明は、

a) 身体試料を、ヒトの組織因子重鎖タンパク質と混合し、免疫反応混合物を作る、
b) その混合物を、抗体が、その試料中に存在するヒトの組織因子と免疫反応し、免疫反応物質を作るのに十分な時間維持する、そして、
c) ステップb) で生じた免疫反応生成物の存在を検出する、
以上のステップを含む身体試料中のヒトの組織因子重鎖タンパク質の存在を決定する方法も考案している。

希釈剤を含有するポリペプチド組成物を、静脈注射で被検者に投与することを含む、生体内で、ヒトの組織因子が、凝集因子Ⅴ/Ⅴaに結合することを阻害する方法を考案している。

別の態様において、本発明は、本発明の抗体組成物を含有するパッケージを含む、試料中のヒトの組織因子重鎖タンパク質の存在を検定する、キットの形をとった診断システムを考案している。その抗体組成物は、

a) TF9-5G9,
b) TF9-5B4,
c) TF9-10H10,
d) TF9-5B7.

からなるハイブリドーマの群から選ばれたハイブリドーマにより生産されるモノクローナル抗体を含むことが望ましい。

また、試料から血液凝集因子Ⅴ/Ⅴaを分離する方法も考案された。

この方法は、

a) 固体マトリックスに固定した、請求項15記載のポリペプチドを含む固体サポートと試料を混合することにより結合反応混合物を作る、
b) 上記結合反応混合物を、上記凝集因子が上記ポリペプチドと結合し、固体複合体及び上清を作るのに十分な時間、維持する、
c) 上記複合体から、上記上清を分離する、そして
d) ステップc) の分離した複合体から、上記凝集因子を回収する、
以上、a) ~ d) のステップを含む。

さらに、実質的に、ヒトの組織因子重鎖タンパク質を含まない、生物学的に活性のあるヒトの組織因子重鎖タンパク質の水溶液を含む組成物を考案した。この生物学的に活性のあるヒトの組織因

子重鎖タンパク質は、リン脂質又は、非イオン性界面活性剤中に分散されていることが望ましい。

血管系液体試料中の凝固能力を決定するための、キットの形をとった診断システムも考案された。それは、実質的にヒトの組織因子経路タンパク質を含まない、少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の、生物学的に活性のある、ヒトの組織因子重鎖タンパク質の水溶液組成物を含有するパッケージを含む。その重鎖タンパク質は、リン脂質中に分散されていることが望ましい。

別の態様において、成熟したヒトの組織因子重鎖タンパク質の調製法及びその方法によるタンパク質発現産物も考案されている。この方法は、

- 栄養増地中、ヒトの組織因子重鎖タンパク質をコードする挿入遺伝子を定義する第1のDNA断片及びその第1の断片に連続し、かつ、上記タンパク質に付随するアミノ酸残基リーダー配列をコードする第2のDNA断片と断片的に結合し、宿主ホ乳細胞と適合する発現ベクターで、上記第1及び第2のDNA断片が上記タンパク質の前駆体型をコードする遺伝子挿入遺伝子を定義するものであるようなベクターを含む組換えDNA分子でトランスフォームした宿主ホ乳細胞の培養を開始する、
 - その培養物を、上記細胞が、上記組換えDNA分子からタンパク質を発現し、かつ、上記成熟型のタンパク質を形成するのに十分な時間維持する、そして、
 - 上記培養物から、上記成熟型のタンパク質を回収する、
- 以上a)~c)のステップを含む。

図面の簡単な説明

図式は本公開の一部を形成している。

第1図は、1文字アミノ酸残基コードを用い、左から右に、ア

トン(k)で示した見かけの分子量をもつ分子量標準物質を示している。

第5図は、15%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子VI/VIIIの親和性で単離したhUTFのオートフルオログラムを示している。hUTFの単離、¹²⁵Iによるラベル化及び電気泳動は、例4と同様に行った。レーンAは、DTTによる還元後の単離したhUTFを示している。レーンBは、DTT還元なしで、電気泳動した同サンプルを示している。上のバンド及び下のバンド(U及びLと表示した)は、各々、約5.8及び4.7kの大きさのhUTFに対応している。オートフルオグラフィ後、上のバンド及び下のバンドを切り出し、DTTを含むSDSサンプルバッファ中で再水和し、第2の15%ポリアクリルアミドゲルのサンプルウェルに入れ、電気泳動した。レーンCは、レーンBから得られた、下のバンドの再電気泳動の結果を示している。レーンDは、レーンBから得られた上のバンドの再電気泳動の結果を示している。12.5及び4.7キロダルトン(k)の見かけ上の分子量をもつタンパク質が矢印で示されている。

第6図は、例4で説明されているように、至るhUTF特異的モノクローナル抗体で免疫沈殿化し、ついで8~17%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子VI/VIIIの親和性で単離したhUTFのオートフルオログラムを示している。レーンAは、DTTによる還元を伴う、電気泳動した¹²⁵Iラベル化hUTFを示している。レーンBは、還元なしで電気泳動した同サンプルを示している。

第7図は、15%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子VI/VIIIの親和性で単離したhUTFのオートフルオログラムを示している。単離、¹²⁵Iによるラベル化、還元及び脱グリコシ

ミノ末端からカルホキシ末端の方向で、ヒトの組織因子重鎖タンパク質の成熟型及び前駆体(各々、hUTFh及びplethTFh)の完全なアミノ酸残基配列を示している。主な天然の成熟型タンパク質のアミノ酸残基配列は、1番から263番に対応する。マインナーな成熟型タンパク質の配列は、3番のアミノ酸残基から始まり、263番の残基で終わる。成熟プロセスで除去されるリーダー配列(前駆体領域)に相当するアミノ酸残基配列は、マイナス番号で示した。細胞外ドメイン及びトランスメンブレン・アンカー領域は各々、部位1~219及び220~242に対応する。

第2図は、1文字ヌクレオチド塩基コードを用い、左から右に5'末端から3'末端の方向で、plethUTFh及びhUTFhタンパク質をコードする、cDNAのヌクレオチド配列を示している。hUTFhの構造遺伝子は塩基130から始まり、塩基918で終わる。

その読み方は、各アミノ酸を示す1文字を、対応するコードの中央の塩基上に置くやり方で、ヌクレオチド配列の上に推察されるアミノ酸残基を付置することにより示した。

第3図は、例2で説明されている、hUTFの凝集活性を測定するのに用いる、凝集決定を示す図である。同対照プロットは、秒とミリリットル当りのピコグラムで表わしたヒトの組織因子(hUTF)濃度で示される、ヒトのクエン酸化血漿凝集(凝血)時間を示したものである。

第4図は、10%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、因子VI/VIII親和性で単離したhUTFhのオートフルオログラムを示している。レーンAは、例4で説明されているように、単離され、電気泳動前に、ジチオスレイトール(DTT)で還元した¹²⁵Iラベル化hUTFを示している。レーンBは、キログル

ムは、例4で説明されているように行った。レーン1は、キログルトンで表わされた見かけ上の分子量をもつ標準物質として電気泳動したタンパク質標準物質：リゾチーム、14.3；カルボニック・アンヒドラーゼ、30.0；オバロブミン、45.0；ウシ血清アルブミン、69.0；ホスホリラーゼb、92.5；ミオシン、200.0(すべて1L州、アリントンハイウ・ファーマシー社より入手)を示している。¹²⁵I-hUTFを含むサンプルをDTT存在下(レーン2及び3)又は非存在下(レーン4及び5)で電気泳動した。これら¹²⁵I-hUTF含有サンプルのいくつかは電気泳動前に脱グリコシル化し(レーン3及び5)、他のものは脱グリコシル化しなかった(レーン2及び4)。

レーン3及び5に流した¹²⁵I-hUTF含有サンプルは、電気泳動前に脱グリコシル化され、レーン2及び4のものは脱グリコシル化しなかった。

第8図は、例9で説明されているように、10%のポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した、免疫親和性で単離されたhUTFのオートフルオログラムを示している。レーン1は、キログルトンで表わされる見かけの分子量をもつ、マーカーとして電気泳動した標準タンパク質：チトクロムC、12.4；ラクトグロブリン、18.4；カルボニック・アンヒドラーゼ、29.9；ラクトール・デヒドロゲナーゼ、35.0；オバロブミン、43.0；グルタマート・デヒドロゲナーゼ、55.0；及びホスホリラーゼb、95.5(全て、MA州ニュートンセンターのディバーシフィード・バイオテック(Diversified Biotech.)から入手した)を含んでいる。

レーン2は、スミス(Smith)等のBCAタンパク質決定法(アナリティカル・バイオケミストリー(Anal. Biochem.)150巻、76~85頁(1985年))を用いて測定し、かつDTT

を用いて還元した約 20 μ g のタンパク質を含んでいる。h u T F 重鎖 (h u T F h) は、明らかに、およそ 47 Mr の位置に確認され、h u T F 軽鎖は、およそ 25 Mr の位置にわずかに確認された。タンパク質は、レムリ (Lacmli) (ネイチャー (Nature), 227 巻, 680~685 頁 (1970)) の報告に従い、コマーシブル染色により可視化した。

第 9 図は、h u T F h の非リン脂質化 (非脂質化) ポリペプチド類似物による、h u T F 由来の凝集開始阻害の投与-応答曲線を示すグラフである。種々の濃度の非脂質化ポリペプチドによる凝集阻害率は、例 12 に説明されているように測定した。テストしたポリペプチドは、p 26-49 (Δ T F 26.49)、p 121-155 (○、T F 121、155)、p 146-167 (●、T F 146、167) 及び p 204-226 (■、T F 204、226) である。

第 10 図は、h u T F h のリン脂質化した (脂質化した) ポリペプチド類似物による、h u T F 由来の凝集開始阻害に関する投与-応答曲線を示すグラフである。その阻害率は例 9 で説明されているように、両方向性により、同類似物に対して測定した。

第 11 図は、組換え DNA プラスミド p C T F 6'4、p C T F 3'14 及び p C T F 4'03 内の Eco R I 断片挿入物の制限地図を示したものである。その挿入物 (—) は、プレ h u T F h 遺伝子の完全なヌクレオチド配列に対応する重複するヌクレオチド配列領域を示している。別に、その挿入物は、第 2 図で示されている、残基 1~486 (p C T F 6'4 に含まれている)、残基 135~775 (p C T F 3'14 に含まれている)、及び残基 776~1125 (p C T F 4'03 に含まれている) 由来のヌクレオチド配列に対応するヌクレオチド配列を、左から右に 5' から

例 19 に述べられているように測定した。白丸 (○) は T F 8-5 G 9 抗体を示し、黒丸 (●) は無関係の抗体を示している。

第 16 図は、抗 T F モノクローナル抗体 T F 8-5 G 9 による精製したヒトの脂質 T F の凝集活性の阻害を示している。リン脂質ベシクル中に再構成された、精製したヒトの脂質 T F の凝集活性は、種々の濃度の精製 IgG と、37℃で 30 分間、前処理した後測定した。丸は、抗 T F 抗体 T F 8-5 G 9 に対するもので、三角は、無関係なコントロール抗体 P A b 100 に対するものである。データは、抗体を加えない場合の活性に対する阻害率として表わされている。

第 17 図は、精製した抗 T F モノクローナル抗体で処理した、培養された J 82 膀胱がん細胞に対する阻害因子 X の結合及び、その細胞による因子 X の形成を示している。因子 X の形成率の阻害の値は、三角で表わされ、因子 X の結合阻害の値は、丸で表わされている。データは、抗体を加えないでインキュベートした細胞を用いて得られる値に対する阻害率で表現されている。パネル A は抗体 T F 9-2 C 4 の効果、パネル B は、抗体 T F 9-5 B 7 の効果を示している。

第 18 図は、例 25 で述べられているような、免疫親和性で単離した h u T F のウェスタンブロット分析を示している。15% ポリアクリルアミドゲルに次に示すものがかけられた。レーン 1 は、ネグロルトン (k) でパネル A の左に示された見かけの分子量をもつ分子量標準が含まれる。レーン 2 は、電気泳動前に還元された、精製ヒトヘモグロビン 1 μ g を含んでいる。レーン 3 は、単離した h u T F を電気泳動前に還元したもの 0.5 μ g を含んでいる。レーン 4 は、非還元、単離された h u T F 0.5 μ g を含んでいる。SDS-PAGE 後、生じたタンパク質バンドを電気

泳動の方向で走っている。また、例 15 で述べられている種々の組換え DNA 分子を精製するのに用いられた挿入物内の制限酵素切断部位のおよその位置も示されている。さらに、完全な形で示されるリーダーペプチド (57) 及びトランスメンブレン・フールドメイン (57) をもつプレ h u T F h タンパク質のおよその位置も示してある。

第 12 図は、h u T F h の非リン脂質化 (非脂質化) ポリペプチド類似物による、h u T F 由来の凝集開始の阻害を示す、投与-応答曲線のグラフである。モル濃度で表わした種々の濃度の非脂質化ポリペプチドによる凝集の阻害率 (%) は、例 12 に述べられているように測定した。試験したポリペプチドは、p 24-35 (Δ)、p 26-49 (○)、p 152-169 (□) 及びペプチド p 40~71、p 72~104、p 94~123 及び p 161~189 であるがこれらは全て、実質的な阻害を示さず、無効的に黒丸 (●) で示した。

第 13 図は、T F 8-5 G 9 抗体組成物による凝集阻害の速度を示すグラフである。凝集の阻害率 (%) は、例 18 で述べられているように測定された種々の抗体免疫反応時間にわたってプロットしてある。

第 14 図は、h u T F 由来の凝集の抗 h u T F 抗体による阻害の投与-応答を示すグラフである。種々の濃度の抗 h u T F モノクローナル抗体 T F 8-5 G 9 による凝集の阻害率 (%) は例 19 に述べられているように測定した。

第 15 図は、h u T F 源がヒトの組織培養細胞系 C M 1381 の細胞破壊物である、h u T F 由来の凝集の、抗 h u T F 抗体による阻害の投与-応答のグラフである。種々の濃度の抗 h u T F モノクローナル抗体 T F 8-5 G 9 による凝集の阻害率 (%) は、

泳動的にニトロセルロースに移した。このようにして作ったウエスタン・ブロットを 0.2 μ g / μ l の親和性精製したウサギ抗 h u T F IgG (パネル A)、1 μ g / μ l のウサギ抗ヘモグロビン IgG (パネル B) 又は、1 μ g / μ l の非免疫ウサギ IgG (パネル C) と免疫反応させた。免疫染色したバンドの見かけの分子量を右に k D a で示した。

発明の詳細な説明

A. 定義

アミノ酸：ここで同定される全てのアミノ酸は、天然の L-型のものである。標準的ポリペプチド命名法に従い (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 243 巻, 3557~59 頁 (1969))、アミノ酸残基の略号は、次の照会表に示されているとおりである。

対 照 表

| 記 号 | アミノ酸 | |
|------------|------------|----------|
| <u>1文字</u> | <u>3文字</u> | |
| Y | Tyr | チロシン |
| G | Gly | グリシン |
| P | Phe | フェニルアラニン |
| M | Met | メチオニン |
| A | Ala | アラニン |
| S | Ser | セリン |
| L | Ile | イソロイシン |
| L | Leu | ロイシン |
| T | Thr | スレオニン |
| V | Val | バリン |
| P | Pro | プロリン |

| | | |
|---|-----|---------|
| K | Lys | リジン |
| H | His | グルタミン |
| Q | Gln | グルタミン |
| E | Glu | グルタミン酸 |
| W | Trp | トリプトファン |
| R | Arg | アルギニン |
| D | Asp | アスパラギン酸 |
| N | Asn | アスパラギン |
| C | Cys | システイン |

ここでは、全てのアミノ酸配列は、従来どおり左から右に、アミノ酸末端からカルボキシ末端への方で示されていることに注意を要する。さらに、アミノ酸残基配列の始め又は終りのダッシュは、各々、アミノ及びカルボキシ末端のH及びOH（水素及び水酸基）のようなラジカルへの結合、もしくは、ポリペプチド鎖における1から約15残基の1つ以上のアミノ酸残基配列を示している。

ポリペプチド及びペプチド；ポリペプチド及びペプチドはここでは、結合型型のアルファアミノ基とカルボキシル基の間のペプチド結合により互いに直線的に結合した、わずかに約50アミノ酸残基を意味するものとして互換的に用いられている。

タンパク質；タンパク質は、ポリペプチドのように互いに直線的に結合した50以上のアミノ酸残基を意味して用いられている。

スクレオチド；糖部分（ペントース）、リン酸及び窒素ヘテロ環塩基からなるDNA又はRNAの単量体ユニット。この塩基はグリコシド塩基（ペントースの1'炭素）を介して糖部分と結合しており、塩基と糖の結合はスクレオチドと呼ばれる。スクレオチドがペントースの3'又は5'部位に結合するリン酸基を含む

ペプチドをコードする構造遺伝子を形成するDNA配列がDNA断片中に含まれることが望ましい。その遺伝子はhUTFh又はプレhUTFhタンパク質中にあるアミノ酸残基をコードする各コドンが中断することなく連続して存在する、すなわち、イントロンを含まない遺伝子であることが好ましい。

従って、第2図に示される、5'末端の約130番から、3'末端の約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、hUTFhを発現することができるDNA断片が本発明の1態様を構成している。第2図に示される、約34番から約918番の部位の配列を基本的に含み、かつ、プレhUTFhを発現できるDNA断片が、本発明のもう1つの態様を構成している。

好ましい、可溶性のhUTFh分子は、hUTFhをコードするDNAの5'末端の約150塩基によってコードされるアミノ酸残基を欠いている。従って、第2図に示される、5'末端の約130番から約756番を経由して、3'末端の約801番の部位までの配列を基本的に含み、かつ、可溶性のhUTFhを発現できるDNA断片は、本発明のさらに好ましい態様を構成する。可溶性のhUTFh構造遺伝子を形成する、典型的な好ましいDNA断片は、第2図に示されている、約130番から約756番約130番から約771番、約130番から約786番、及び約130番から約801番で表わされるスクレオチド配列を有するものである。

可溶性プレhUTFhをコードする、好ましいDNA断片は、それらが、第1図に示されるように、-32番から0番までのアミノ酸残基で示されるような、アミノ末端リーダー配列を含むタンパク質をコードしていること以外は、可溶性hUTFhをコードしているものと同じである。従って、可溶性プレhUTFh

とを、それをスクレオチドと呼ぶ。

塩基対（bp）；二本鎖DNA分子内でのアデニン（A）とチミン（T）又はシトシン（C）とグアニン（G）の組合せ。

B. DNA断片

生物において、タンパク質又はポリペプチドのアミノ酸配列は遺伝子コードを介して、そのタンパク質をコードする構造遺伝子のデオキシリボ核酸（DNA）配列に直接関係づけられる。従って、構造遺伝子は、それがコードするタンパク質又はポリペプチドのアミノ酸残基配列で定義することも可能である。

重要でかつよく知られた遺伝子コードの性質にリダグンシーがある。すなわち、タンパク質を作るのに用いられるほとんどのアミノ酸に対し、1つ以上のコードするスクレオチド・トリプレット（コドン）が、1つのアミノ酸残基をコード又は指定している。それ故、1つのアミノ酸残基配列をコードするのに多くの異なるスクレオチド配列が存在することになる。そのようなスクレオチド配列は、全ての生物において、同じアミノ酸残基配列を生産することが可能なので、機能的には等価であると考えられている。場合によっては、プリン又はピリミジンのメチル化物がスクレオチド配列の中に組み込まれている事もある。しかし、そのようなメチル化は、コード関係にはなんら影響しない。

本発明のDNA断片は、ヒトの組織因子重複タンパク質(huTFh)をコードするDNA配列を含むという特徴をもつ。好ましい態様において、このDNA断片は、ヒトの組織因子重複前駆体タンパク質(プレhUTFh)をコードするDNA配列を含んでいる。すなわち、本発明のDNA断片は、hUTFh、また、より好ましくは、プレhUTFhの構造遺伝子の存在で特徴づけられる。さらに、可溶性のhUTFh又は可溶性のプレhUTFhタン

をコードする構造遺伝子を形成している、好ましいDNA断片は、基本的に、第2図に示されている5'末端の約34番から756番を経由して、3'末端の約801番で示される配列を含んでいる。典型的な好ましい可溶性のプレhUTFhコードのDNA断片とは、第2図に示されているところの、約34番から約756番、約34番から約771番、約34番から約786番及び約34番から約801番のスクレオチド塩基配列を有するものである。

可溶性も含めて、上記hUTFh及びプレhUTFhタンパク質をコードする相同的DNA及びRNAも先に議論したように考慮された。

hUTFh及びプレhUTFhをコードするDNA断片は化学的技術、例えばマテウシ(Hallencel)等のホスホトリエステル法(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサィエティー(J. Am. Chem. Soc.) 103巻3185頁(1981年))により容易に合成できる。(ここで引用されている技術の公開は参考として送達されている。)もちろん、コード配列を化学的に合成することにより本来のアミノ酸残基配列をコードする代りに適当な塩基を用いることにより、いかなる修正も望みどおりにすることができる。しかし第2図に示されているものと全く相同的な配列を含むDNA分子の方が望ましい。

さらに、基本的にhUTFh及びプレhUTFhタンパク質をコードする構造遺伝子を含むDNA断片は、これらの遺伝子を含む組換えDNA分子から得ることができる。例えば、プラスミドタイプの組換えDNA分子pCTF64、pCTF314及びpCTF403はいずれもhUTFh及びプレhUTFhタンパク質の異なる領域をコードするDNA配列を含んでおり、また、これらを

合せると、各タンパク質を発現するのに必要な全てのDNA配列を有することになる。各々、pCTF64、pCTF314又はpCTF403でトランスフォームした大腸菌の培養物は、1987年3月27日、ブダペスト協定に基づき、MD州、ロックビル、パークローン、ドライブ12301番、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)に保管され、各々、受番番号67370、67358及び67369が割当てられた。

hUTFh又はプレhUTFhをコードするDNA配列を含むDNA断片は、よく知られている方法を用い、先に述べた各プラスミドからの適当な制限断片を機能的に結合することにより作ることができる。典型的に、本方法で作られた本発明のDNA分子は、粘着末端、すなわちこの分子の二本鎖領域を越えて伸びた“突き出した”一本鎖領域をもっている。本発明のDNA分子上に粘着末端があることは望ましいことである。

本発明は、上述のDNA断片と等価なリボ核酸(RNA)も考慮している。

C. 組換えDNA分子

本発明の組換えDNA分子は、本発明のDNA断片をベクターに機能的に結合することにより作ることができる。

ここで用いられているように、“ベクター”という言葉は、細胞中で自己複製できるDNA分子で、別のDNA断片を機能的に結合することができ、その結合した断片の複製をもたらすものを意味する。hUTFh及びプレhUTFh遺伝子の発現を司ることができるベクターは、ここでは“発現ベクター”と呼ばれる。従って、組換えDNA分子(rDNA)とは、天然においては通常一対に存在することはない少なくとも2つのヌクレオチド配列を含むハイブリッドDNA分子のことである。

バイオラッド・ラボラトリーズ社)及びpPL、pKK223(MJ州、ビスカトゥエイ、ファルマシア社)がある。

真核細胞、好ましくは管性生物細胞と適合する発現ベクターも、本発明の組換えDNA分子を作るのに用いられる。真核細胞発現ベクターもこの分野でよく知られており、数社から市販されている。典型的にはこれらのベクターは、目的とするDNA断片の挿入に便利な制限部位を含んでいる。これらのベクターの典型的なものには、pSUL及びpKSV-10(ファルマシア社)、pBPV-1/pML2d(インターナショナルバイオテクノロジー社)及びpTDT1(ATCC、#31255)がある。

好ましい態様において、本発明の組換えDNA分子を構築するのに用いられる真核細胞発現ベクターは、真核細胞中で効果的な選択マーカー、好ましくは、薬剤耐性選択マーカーを含んでいる。好ましい薬剤耐性マーカーとは発現によりネオマイシン耐性となる遺伝子、すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子である。サウザーン(Southern)等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンド・アプライド・ジェネティクス(J. Mol. Appl. Genet.)1巻、327~341頁(1982年)。

本発明のrDNAを作るための、レトロウイルス発現ベクターの使用も考慮されている。ここで用いられているように、“レトロウイルス発現ベクター”とは、レトロウイルスゲノムのロングターミナル・リピート(LTR)領域由来のプロモーター配列を含むDNA分子を意味する。

好ましい態様において、典型的な発現ベクターは、真核細胞中では複製不能なレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルスの構築と使用法は、ソージ(Sorge)等により報告されてい

る。本発明のDNA断片を機能的に結合させるベクターの選択は、この分野ではよく知られているように、例えば、タンパク質の発現などの機能的性質及びトランスフォームされる宿主細胞などが組換えDNA分子の構築技術の上で本質的な制限となることから、これらに直接依存する。しかし、本発明によって考案されたベクターは、これに機能的に結合しているDNA断片中に含まれるhUTFh又はプレhUTFh遺伝子の、少なくとも複製を、好ましくは発現をも可能にする。

好ましい態様において、本発明により考案されたベクターは、原核性のレプリコン、すなわち、バクテリア宿主細胞のような原核細胞中の、これをトランスフォームした染色体外組換えDNA分子の自己複製及び維持を可能とするDNA配列を含んでいる。このようなレプリコンは、この分野ではよく知られている。さらに、原核性レプリコンを含むこれらの態様は、これをトランスフォームしたバクテリア宿主に薬剤耐性を与える遺伝子も含んでいる、典型的なバクテリアの薬剤耐性遺伝子は、アンピシリン又はテトラサイクリンに対する耐性を与えるものである。

原核性レプリコンを含む、これらのベクターは、これをトランスフォームした大腸菌のようなバクテリア宿主細胞中で、hUTFh又はプレhUTFh遺伝子を発現(転写及び翻訳)させることができる原核性プロモーターも含んでいる。プロモーターとは、RNAポリメラーゼの結合を許し、転写を開始させる、DNA配列で成る発現コントロール要素である。バクテリア宿主と適合するプロモーター配列の典型的なものは、本発明のDNA断片の挿入に便利な制限部位を含むプラスミドベクター中に存在する。このようなベクタープラスミドの典型的なものには、pUC8、pUC9、pBR322、pBR329(CA州、リッチモンド、

モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.)4巻、1730~1737頁(1984年)。

相補的なホモポリマー末端を介して、DNAをベクターに機能的に結合する多くの方法が開発されてきている。例えば、相補的なホモポリマーを、挿入するDNA断片及びベクターDNAに付加することができる。それから、このベクターとDNA断片を相補的なホモポリマー末端間の水素結合で結合し、組換えDNA分子を作る。

1つ以上の制限部位を含む合成リンカーは、DNA断片をベクターに結合するもう1つの方法を提供する。先に報告されているように、エンドヌクレアーゼで制限消化することによって生成したDNA断片を、3'-5'エンドヌクレアーゼ活性で突出する3'、一本鎖末端を除き、また重合活性で、くぼんだ3'末端を充填する酵素、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ又は、大腸菌DNAポリメラーゼIで処理する。従って、これらの活性の組合せで、平滑末端DNA断片が生ずる。それから、この平滑末端断片を、バクテリオファージT4 DNAリガーゼのような、平滑末端DNA分子のライゲーションを触媒することができる酵素の存在下、大過剰のリンカー分子とインキュベーションする。このような反応でその末端にポリリンカーをもつDNA断片ができる。さらにこのDNA断片を適当な制限酵素で切断し、このDNA断片と適合する末端を作る酵素で切断した発現ベクターとライゲーションする。

多量の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーは、CN州ニューヘブーン、インターナショナル・バイオテクノロジー社を含む多くの会社から市販されている。

本発明は、上述の組換えDNA分子と等価なRNAも考慮して

いる。

D. トランスホームした細胞と培養

本発明は、本発明の組換えDNA分子、好ましくは可溶性のh u T F h又はプレh u T F hを発現できるr DNAでトランスホームした宿主細胞にも関連している。この宿主細胞は、原核性でも真核性でもよい。バクテリア細胞は、原核宿主細胞であることが好ましく、また典型的には、ND州ベセスダ、ベセスダ・リサーチラボラトリーズ社から入手できる大腸菌DH5株のような、大腸菌の株である。好ましい真核性宿主細胞には、イースト及びホ乳類細胞、好ましくはマウス、ラット、サル又はヒトの癌腫芽細胞系列のような脊椎動物細胞が含まれる。好ましい真核性宿主細胞には、CCL61としてATCCから入手できるチャイニーズ・ハムスターの卵巣(CHO)細胞及びCRL1658としてATCCから入手できるNIHスィスマウス胚細胞がある。

本発明の組換えDNAによる適当な細胞宿主のトランスホームーションは、典型的には用いるベクターのタイプに応じて、よく知られている方法により行なわれる。例えば、原核性宿主細胞のトランスホームーションに関しては、コーエン(Cohen)等のプロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、69巻、2110頁(1972年)；及びマニアチス(Maniatitis)等のNY州コールド・スプリング・ハーバー・コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー、ラボラトリー・マニュアル、モレキュラー・クロニングを参照せよ。脊椎動物細胞のr DNAを含むレトロウイルス・ベクターによるトランスホームーションに関しては、例えば、ゾージ(Sorge)等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 4巻、1730~1737頁(1984

年)、グラハム(Graham)等、ウィロロジー(Virol.)、52巻、456頁(1973年)；及びウィグラー(Wigler)等、プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、76巻、1313~1315頁(1979年)を参照せよ。

うまくトランスホームされた細胞、すなわち、本発明の組換えDNA分子を含む細胞は、従来の方法によって同定することができる。例えば、本発明のr DNAの導入から生じた細胞をクローニングし、モノクローナルコロニーを作る。これらのコロニーから細胞を収獲し、溶解し、そのDNA内容物について、サウザーン(Southern)(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.) 98巻、503頁(1975年)又は、ベレント(Borent)等(バイオテクノロジー(Biotech.) 3巻、208頁(1985年)によって報告されている方法を用いて、そのr DNAの存在を調べた。

r DNA存在の直接的検定に加え、成功したトランスホームーションは、そのr DNAがh u T F h又はプレh u T F hを発現することができるときは、従来の免疫学的方法で確かめることができる。例えば、発現ベクターでうまくトランスホームーションできた細胞は、h u T F h又はプレh u T F h抗原性を示すタンパク質を生産する。トランスホームさせた細胞試料を収獲し、本発明のハイブリドーマによって生産される抗原等に特異的な抗体を用い、h u T F h又はプレh u T F hを検定する。

このように、トランスホームした宿主細胞それ自体に加え、本発明は、栄養培地中のそれらの細胞の培養物好ましくは、モノクローナル(クローニング的に均一な)培養物、又は、モノクローナル培養物由来の培養物も考案した。この培養物は、h u T F h又は

プレh u T F h抗原性を示すタンパク質、またさらに好ましくは、生物学的に活性なh u T F hを含むことが望ましい。

プレh u T F h抗原性を示すタンパク質、またさらに好ましくは、生物学的に活性なh u T F hを含むことが望ましい。

トランスホームした宿主細胞を培養するのに有用な栄養培地は当分野ではよく知られており、また、いくつかの販売会社より市販されている。宿主細胞がホ乳類細胞であるような態様においては、“無血清”培地を使うことが望ましい。

E. h u T F h及びプレh u T F hタンパク質の生産方法

本発明の別の特徴には、h u T F h抗原性を示すタンパク質の生産方法がある。h u T F h抗原性を示すタンパク質は天然の組織因子によって誘導される抗体を免疫反応を起こすタンパク質である。h u T F h抗原性を示すタンパク質は、抗原として有用であり、又、抗体を生じさせるときにも有用で、その各々が本発明の診断システムや診断法で使用する事ができる。

本方法は、h u T F h又はプレh u T F h、好ましくは可溶性のh u T F h又は可溶性のプレh u T F hを発現することができる、本発明の組換えDNA分子でトランスホームした宿主細胞、好ましくは、ヒトの細胞を含有する栄養培地を含む培養の開始する。この培養を、そのトランスホームした細胞がh u T F h又はプレh u T F hタンパク質を発現するのに十分な時間維持する。発現したタンパク質をその培地から回収する。好ましい態様において、本発明の方法によって作られたh u T F hタンパク質はさらにh u T F hの生物学的活性すなわち、因子Ⅷ/Ⅷaと結合する能力を示す。これらの方法は、宿主細胞においてプレh u T F h遺伝子を発現できる組換えDNA分子でトランスホームしたホ乳類宿主細胞の培養を含んでいる。その培養により、プレh u T F hタンパク質が発現し、つづいて、そのプレh u T F hの細胞内での翻訳後の修正が起こり、生物学的に活性のあるh u T F hタン

パク質が生じる。

培養物から、発現したタンパク質を回収する方法は、当分野ではよく知られたことであり、従来の生化学的方法を用い、その培養物のタンパク質含有百分の百分の百分が含まれる。例えば、タンパク質の百分に対して知られているゲル濾過法、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティ・クロマトグラフィー及びそれに類するものが、培養物中にある発現タンパク質の単離に用いることができる。さらに、免疫親和性、免疫吸着やそれに類するもののような、免疫化学的方法も、従来法を用いて行なわれる。

F. h u T F h及びプレh u T F hタンパク質組成物と発現産物

本発明は、また本発明のr DNAのh u T F h及びプレh u T F hタンパク質発現産物も考案している。好ましい態様において、h u T F h及びプレh u T F h発現産物は第1図で示されているように、各々残基1から263及び32から263に対応するアミノ酸残基を有している。その発現タンパク質は、第1図で示されるプレh u T F h及びh u T F hのアミノ酸残基配列の長さの少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%であることが望ましい。

別の態様において、可溶性のh u T F h及びプレh u T F hと、可溶性h u T F hそして、または可溶性プレh u T F hを含む組成物も考案されている。ここで用いている“可溶性”という言葉は、本来のh u T F h及びプレh u T F h分子の細胞外ドメイン、すなわち、第1図に示すところのアミノ酸残基220までの、h u T F h及びプレh u T F h分子領域を基本的を含むことを特徴とするh u T F h及びプレh u T F h分子を意味する。それゆえ、可溶性h u T F h及び可溶性プレh u T F hは、本来の分子で形成されるトランスメンブレン・アンカー領域の實質的部

平成 7.12.20 発行

分（第1図で示すところの残基220から242）を含まない。ここで用いている“h u T F h”及び“プレh u T F h”という言葉は今後特にことわらないかぎり、そのタンパク質の可溶性を含んでいる。

可溶性のh u T F h及び可溶性プレh u T F hは、疏水的なトランスメンブレン・アンカー領域を含んでいないので、これらは、生理学的に許容される水溶液中で実質的に凝集することはない。それゆえ、可溶性のh u T F h及び可溶性のプレh u T F hは、存在するh u T F h又はプレh u T F hタンパク質の少なくとも約70%、好ましくは約80%、そしてより好ましくは約90%（重量パーセント）が非凝集（単量体）型であり、タンパク質濃度約0.1 p g / m l から約100 n g / m l の生理学的に許容された稀釈率を用いた水溶液を作りうることを特徴とする。タンパク質溶液中に存在する凝集量の測定法は、当分野ではよく知られているところであり、排除カラムクロマトグラフィーによるサイズ分画を含んでいる。

好ましい可溶性h u T F hタンパク質は第1図で示されているところの、アミノ末端の残基約1番から、209番を経由してカルボキシ末端の残基224番で示されるアミノ酸残基を示している。従って、好ましい可溶性h u T F hタンパク質は第1図で示すところの約1番から約209番、約1番から約219番及び約1番から約224番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するものである。

好ましい可溶性プレh u T F hタンパク質は、第1図で示すところの、アミノ末端の-32番から、209番を経由して、カルボキシ末端の224番の残基で表わされるアミノ酸残基を有している。従って、好ましい可溶性プレh u T F hタンパク質は、第

下、血管系液状サンプルを凝集する能力を意味する。凝集能力を決定するのに十分な、典型的h u T F hタンパク質濃度は、例2におけるサンプル/h u T F h比と同じ比を用いたとき、約0.1 p g / m l から約100 n g / m l、好ましくは、約1 p g / m l から約10 n g / m l、そしてより好ましくは約10 p g / m l から約1 n g / m l である。もちろん、凝集能力を決定するときに必要な温度よりも高い温度であるが、好ましい濃度に希釈しうるh u T F h溶液も考慮されている。

好ましい態様において、h u T F h含有水溶液は、リン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散されたh u T F hを含んでいる。典型的リン脂質：h u T F hタンパク質重量比は、約5：1から12000：1、好ましくは、約50：1から約5000：1そしてさらに好ましくは、約100：1から2500：1の範囲である。

G. ポリペプチド

本発明の各ポリペプチドは、せいぜい約50個、より通常には約35個以下の、そして好ましくは約25個以下のアミノ酸残基を含んでおり、かつ、少なくとも10個の残基を含んでいる。さらに、本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸残基配列及び新しい凝集特性を特徴としている。

従って、本発明のポリペプチドの1つの態様は、血液凝集因子W/Waへのh u T F hの結合を競合的に阻害する能力をその特徴の1部としている、h u T F h結合部位ポリペプチド類似物である。本発明の結合部位類似物は活性化された複合体を作ることなく、すなわち、凝集を開始することなく因子W/Waに結合することが望ましい。

ここで用いている“複合体”という言葉は、抗原-抗体又は、

1図で示すところの約-32番から214番、約-32番から219番、及び約-32番から約224番の残基で表わされるアミノ酸残基配列を有するものである。

1つの態様において、h u T F h及びプレh u T F h発露物はグリコシル化されていない。すなわち、それらは、本発明のrDIIでトランスフェームした原核細胞中で生産される。

非グリコシル化型のh u T F h及びプレh u T F hは、本発明の接種物及び診断システムにおける免疫原及び抗原として有用である。

典型的には、真核細胞で生産されたh u T F h及びプレh u T F hはグリコシル化されており、また抗原性及び免疫原性に加えて、生物学的活性を有する。ここで用いられているように、“生物学的活性”という語句は、因子W/Waの依存の凝集を誘導する能力をもつh u T F h又はプレh u T F hタンパク質又はポリペプチドを指して使われる。

このように、本発明は、実質的にヒトの組織因子凝集タンパク質を含まない生物学的に活性なh u T F hを含有する水溶液を含む組成物を考案している。その組成物も実質的に例えばラウリル硫酸ナトリウム等のイオン性界面活性剤、ポリアクリルアミド及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で測定される約、15000ダルトン以下の見かけの分子量を有する組織由来のタンパク質のような物質を含まないことが望ましい。

水溶性のh u T F h含有溶液は血液又はクエン酸化した血漿のような血液由来の産物のような血管系液状サンプルの凝集能力を決定するのに十分な生物学的に活性のあるh u T F hを含んでいる。“凝集能力”という語句は生物学的に活性なh u T F h存在

レセプター-リガンド反応のような特異的結合反応の産物を意味している。代表的複合体としては、免疫反応産物及びここでTFI W/Waと示されているところの組織因子-因子W/Wa結合反応産物がある。

好ましい態様において、h u T F h結合部位類似物は、少なくとも第1図に示されている30-35番のアミノ酸残基を表わしている次に示すアミノ酸残基配列：

-VNQVYVT-

を含んでいる。

さらに好ましくは、h u T F h結合部位類似物は、少なくとも、次のアミノ酸残基配列：

-VNQVYTVQIST-及び

-LYYWKSSSSGKKT-

のうちの1つを含んでいる。

これらの配列は、第1図で示すところの各々、30-40及び155-167番の、h u T F hのアミノ酸残基を示している。

さらに一層好ましい場合は、h u T F h結合部位類似物は第1図で示すところの、各々26-49番及び146-167番で表わされている、次のアミノ酸残基配列：

-EPNPVHQVYTVQISTSGQWESC-、及び

-VFGKDLITLYYWKSSSSGKKT-

からなる群から選ばれたアミノ酸残基配列を含む。

好ましいh u T F h結合部位ポリペプチド類似物は第1表で示されているアミノ酸残基配列を含んでいる。

第 1 表

| 名 称 | アミノ酸残基配列 |
|----------|-------------------------------------|
| p24-35 | H-ENEPKPVHVVYT-OH |
| p26-49 | H-EPKPVHVVYTQISTKSGD-KSKC-OH |
| p144-159 | H-RDVFGKDLIYTLYYNK-OH |
| p146-167 | H-VFGKDLIYTLYYKSSSSGKXT-OH |
| p159-169 | H-IYTLYYKSSSSGKXTAK-OH |
| p157-169 | H-YWKSSSSGKXTAK-OH |
| p161-189 | H-SSSGKXTAKTHTNEFLIDVDKGDZNYCFSV-OH |

a. 各ポリペプチドの実験名は第 1 図の、含まれているアミノ酸残基配列を要約している。

ポリペプチド p26-49、p146-167 及び p161-189 も、抗 h u T F h 抗体分子が h u T F h に結合するのを中和（競争的阻害）する能力を特徴としている。抗 h u T F h 抗体の h u T F h への結合を中和する能力をもつ本発明の他のポリペプチドは、第 2 表に示されているものである。

第 2 表

| 名 称 | アミノ酸残基配列 |
|----------------------|---|
| p1-30 | H-EGTINTVAAYHNLTKSINFKTILEKPKPV-OH |
| p40-71 | H-TKSGDKKCFYITDTECDLIDEIVKDVQKTY-OH |
| p41-49 | H-KSGDKKSKC-OH |
| p56-71 | H-ECDLIDEIVKDVQKTY-OH |
| p72-104 ^c | H-LARVFSYPAGIVESTGSGAGEPLYNSPEFTPYLC-OH |
| p94-123 | H-YEHSPEFTPYLLETHLGQPTIQSFQVGVTKV-OH |
| p190-209 | H-QAVIPSRVTHRKSTDSPPVEC-OH |

a. 実験名に付けられた“c”は、タンパク質結合のためのリンカーとして、示されている配列に付け加えられたシステイン。

れる。リンキングに使われる典型的アミノ酸残基は、チロシン、システイン、リジン、グルタミン酸及びアスパラギン酸とそれに類するものである。さらに、本発明のポリペプチドは、末端期、基アシル化、例えばアセチレーション又はチオグリコン酸アミデーション、クローナルカルボキシアミデーション、例えば、アンモニア、ノチルアミン、その他により配列が修飾を受けていることで、天然の配列とは異なることがある。

キャリアー・ヘプテレンのように、当分野でよく知られているリンカーを介してのキャリアーとの結合の場合、本発明のポリペプチドは、h u T F h と免疫反応する抗体を誘導することができる。免疫学的な交差反応性の明白な原則からみて、本発明は、第 1 表及び第 2 表に示されているポリペプチドの抗原的に関連したバリエーションも考案している。“抗原的に関連したバリエーション”とは、第 1 表もしくは第 2 表のポリペプチドの、少なくとも 6 個のアミノ酸残基配列領域を含み、かつ、第 1 表又は第 2 表のポリペプチド及び h u T F h と免疫反応を起こす抗体分子を誘導することができるポリペプチドのことである。

また、ポリペプチドがリン脂質又は非イオン性界面活性剤中に分散した、h u T F h 結合部位ポリペプチド類似物の水性溶液を含む組成物を、本発明は考案している。典型的なリン脂質：ポリペプチド重量比は、約 5 : 1 から 200 : 1、好ましくは約 30 : 1 ~ 80 : 1、さらに好ましくは、約 45 : 1 ~ 55 : 1 の範囲にある。リン脂質中に分散して使用するのに適している好ましい h u T F h 結合部位類似物をセクション II の第 4 表にリストした。

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドの分野ではよく知られているいくつかの方法で合成することができる。使用しうる多くの技術のすぐれたまとめは、J. H. スチュワード (Steward) 及び

ン残基を示している。

本発明のポリペプチドは、そのポリペプチドが因子Ⅱ/Ⅲ a への結合に対し、本来の組織因子と競合でき、そして、または、h u T F h に対する抗 h u T F h 抗体分子の結合を競合的に阻害しうるかぎり、h u T F h のアミノ酸残基配列と同一である必要がないことを理解すべきである。それ故、本ポリペプチドは、使用する際に有利となるような、保存的、非保存的にかかわらず挿入、欠失及び置換のような種々の変換を与えることができる。

保存的置換には、あるアミノ酸残基が他の生物学的に同様の残基に置き換ったものである。保存的置換の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニンのような脂肪族残基間の置換又は、アルギニンとリジン、グルタミン酸とアスパラギン酸又はグルタミンとアスパラギン及びそれに類するもののような極性残基間の置換がある。また“保存的置換”という語句には、もし、ポリペプチドが、必要とされる結合活性を示すならば、未置換の元々のアミノ酸の代りに、置換されたアミノ酸を置換することも含まれる。

本発明のポリペプチドが、1 つ以上の保存的、もしくは非保存的置換をしているために、本来の h u T F h の配列と同一ではない場合、本発明のポリペプチドがラベル又は固体マトリックス、又はキャリアーにうまく固定する“リンカー”を提供する目的で、その各末端に付加的残基をつけ加える場合は別にして、アミノ酸残基の通常せいぜい約 20 パーセント、より普通には、せいぜい 10 % が置換している。本発明のポリペプチドと共に使用されるラベル、固体マトリックス及びキャリアーは以下に述べる。

通常、アミノ酸残基リンカーは、少なくとも 1 残基であり、また 40 以上の残基のこともあり、しばしば 1 ~ 10 残基が用いら

J. B. ヤング (Young) の“固相ペプチド合成” (1969 年、サンフランシスコ、W. H. フリーマン (Freeman) 社) 及び J. メイエンホーファー (Meyenhofer) の“ホルモン性タンパク質及びペプチド” (1983 年、アカデミックプレス社 (ニューヨーク)、2 巻、46 頁) が固相ペプチド合成について、また E. シュローダー (Schroder) の“ペプチド” (1965 年、アカデミックプレス社 (ニューヨーク) 1 巻) が古典的な液相法について行なわれている。

II. 接種物

別の組織において、本発明のポリペプチド又は、その抗原的に関連したバリエーションは、生理学的に許容しうる水性希釈剤組成物として、その効果的量が投与された時、h u T F h と免疫反応する抗体を誘導することができる接種物となる。種々の文法型の“接種物”という語は、h u T F h に対する抗体の調製に用いられる活性成分として、本発明のポリペプチドを含む組成物として、ここで使用されている。ポリペプチドの抗体を誘導するのに用いられるとき、そのポリペプチドは、単独で、又は結合体としてキャリアーと結合して、又は、ポリペプチド重合体として用いられるのであるが、表現の簡便性のため、本発明のポリペプチドの種々の態様は、全て、“ポリペプチド”という語及びその種々の文法型で呼ばれていることを理解されよう。

約 35 以下のアミノ酸残基を含むポリペプチドに対し、すでに記されているように抗体生産の誘導のためには、キャリアーに結合したペプチドを使用する方が望ましい。

すでに記してきたように、1 つ以上の付加的アミノ酸残基をポリペプチドのキャリアーへの結合を助けるため、そのポリペプチドのアミノ又はカルボキシ末端に付加することができる。ポリペ

ブチドのアミノ又はカルボキシ末端へ付加したシステイン残基は、ジスルフィド結合を介して、結合体を作るのに特に有用であることが分っている。しかし、結合体を調製する当分野でよく知られている他の方法も使用しうる。代表的付加結合法にはミカエル付加反応産物、グルタルアルデヒドのようなジナルデヒド（クリプスタイン（Klipstain）等（ジャーナル・オブ・インフェクシャスデシーズ（J. Infect. Dis.）、147巻、318～326頁、（1983年））及びそれに類するものの使用、又は、キャリアーに対し、アミド結合を生ずる、水溶性カルボジイミドの使用のような、カルボジイミド法の使用が含まれる。活性官能基を介してのタンパク質の結合については、オーラメアス（Aramias）等のスカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー（Scand. J. Immunol.）8巻、補1、7、7～23頁（1978年）を参照せよ。

有用なキャリアーは、当分野ではよく知られており、一般的にはタンパク質そのものである。そのようなキャリアーの代表例としては、キーホール、リンペット、ヘモシアニン（XLIH）、エデスチン、チログロビン、子ウシ血清アルブミン（BSA）やヒト血清アルブミン（HSA）のようなアルブミン類、ヤギ赤血球（SRBC）のような赤血球類、テクナストキソイド、コレラトキソイド、ポリ（D-リジン：D-グルタミン酸）のようなポリアミノ酸及びこれに類するものがある。

キャリアーの選択は、その接種物の最終的使用法に依存しており、本発明に特に関係しない基準に基づいている。例えば、接種される動物中で不都合な反応を起こさないキャリアーが選択されるべきである。

本発明の接種物は、典型的には、キャリアーに結合した結合物

びイムノグロブリン分子の免疫学的に活性な領域すなわち抗体結合部位又はパラトープを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来のイムノグロブリン分子、実質的に本来のものと同一イムノグロブリン分子及びFab、Fab'、F(ab')₂、及びF(v)として、当分野で知られている領域を含む、パラトープを含有する、イムノグロブリン分子の一部がある。

本発明の抗体組成物は、h u T F h及び本発明の特異的ポリペプチドの少なくとも1つと免疫反応を起こす抗体分子を含むことを特徴とする抗原ペプチド抗体である。

例えば、h u T F h及び組織因子結合部位のポリペプチド類似物と免疫反応する抗体分子を含む、本発明の抗体組成物は組織因子が因子Ⅲ/VⅢaと結合する能力を中和できる。従って、好ましい抗体組成物は、h u T F h及びp 26-49又はp 146-167と反応し、かつ、p 204-226と実質的に免疫反応しない抗体分子を含むものである。h u T F hに対して生ずるモノクローナル抗血清は、p 204-226と免疫反応する抗体を含むことに注意すべきである。このように、抗204-226免疫反応性が実質的にないことが、本抗体組成物と従来の報告されているものとを区別する特性となっている。

本発明の抗体組成物の典型的生産は、ホ乳動物を、本発明の接種物で免疫化し、適当なポリペプチド免疫特性を有するホ乳類抗体分子を誘導することによって行なわれる。さらに、その抗体分子をそのホ乳動物から収集し、例えば、免疫アフィニティ・クロマトグラフィーのような従来技術によって、その必要量を単離する。このように生産した抗体組成物は、なにかんずく、診断法及び身体サンプルにおけるh u T F hを検出するための、本発明のシステムで用いることができる。

として、効果的な免疫原量の本発明のポリペプチドを含む。他の事項の中で、単位投与量当たりの効果的なポリペプチド量は、当分野ではよく知られているように、接種される動物種、その動物の体重及び選択した接種レジメンに依存する。典型的に、接種物は、接種（投与）当たり約1.0マイクログラムから約500ミリグラム、好ましくは、約50マイクログラムから約500ミリグラムのポリペプチドを含んでいる。

本発明の接種物に用いられている“単位投与”という語句は、各ユニットが、必要とする希釈剤、すなわち、キャリアー又はビヒクルと共に望ましい免疫原的効果を産むのに必要な予め決められた量の活性物質を含む、動物に対する1回の投与に通じた物理的に分離した単位を意味する。本発明の接種物の新しい単位投与に関する明細は、活性物質の独特な特性及びその独自の免疫学的効果、及び同ここで詳細に公開されている動物中での免疫学的使用に内在する制限により説明され、かつ直接依存しており、これらが本発明の特徴となっている。

典型的には、接種物は、水、食塩水又はリン酸緩衝食塩水などの生理学的に許容された（受容できる）希釈剤中にポリペプチド-結合体を分散させることにより、乾燥した固体のポリペプチド結合体から水性組成物を調製することができる。

また、接種物は希釈剤の一部として、アジュバントを含んでいる。完全フロイントアジュバント（CFA）、不完全フロイントアジュバント（IFA）及びミョウバンのようなアジュバントは、当分野ではよく知られており、いくつかの会社から市販されている。

1. 抗体及び抗体組成物

種々の文法型の“抗体”という語は、イムノグロブリン分子及

モノクローナル抗体組成物も、本発明で考案されている。検出限界内で、モノクローナル抗体組成物は、効果的にh u T F hを結合しうる、唯一種類の抗体結合部位を含んでいる。従って、典型的に、本発明のモノクローナル抗体組成物は、それがh u T F h以外のタンパク質を結合できる抗体をたとえ含んでいたとしても、h u T F hへの結合親和性を示す。ひとつの態様において、モノクローナル抗体組成物は、h u T F h及び、組織因子結合部位のポリペプチド類似物、好ましくはp 26-49又はp 146-167と免疫反応する抗体分子を含んでいる。

他の態様において、本発明は、h u T F hと免疫反応し、h u T F hにより開始する凝集を阻害する抗体分子を含む抗凝集（中和）MoAbを考案した。さらに凝集を阻害する好ましいMoAbは本発明のポリペプチド、好ましくは、h u T F h結合部位ポリペプチド類似物、及びさらに好ましくは、第1表で示されているポリペプチドと免疫反応することとを特徴とする。

他の態様において、抗凝集MoAbは、h u T F h及びh u T F b：因子Ⅲ/VⅢaの複合体と免疫反応し、h u T F hによって開始する凝集を阻害（中和）する抗体分子を含んでいる。さらに、好ましい抗凝集MoAbはh u T F hポリペプチドp 1-30又はp 26-49と免疫反応することとを特徴とし、またこれは、h u T F hポリペプチドp 56-71と免疫反応しないことが好ましい。

また、本発明は、組織因子の凝集を開始する能力を中和しない抗体分子を含む非中和性モノクローナル抗体組成物も考案した。そのような組成物は、h u T F h及びポリペプチドp 1-30と免疫反応し、かつ、ハイブリドーマTF9-10H10により生産（分泌）される抗体分子を含むことが望ましい。

本発明のモノクローナル抗体組成物は、適当なポリペプチド特

異性をもつ抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養増地を含む、モノクローナルハイブリドーマの培養を開始することによって生産することができる。

このハイブリドーマが増地中に、その抗体分子を分泌するのに十分な条件及び時間、培養を維持する。それから、抗体含有増地を収穫する。さらにこの抗体分子を従来法により単離する。

これらの組成物の調製に有用な増地は、当分野ではよく知られておりまた、市販されている、合成培養増地、同血漿増地マウス及びそれに類するものが含まれている。代表的合成増地は、4.5 g/lのグルコース、2.0 mMグルタミン及び2.0%ウシ胎児血清を補足した、ダルベコ最小増地 (DMEM; ダルベコ (Dulbecco) 等、ヴィロロジー (Virology)、8巻、396頁 (1959年)) である。代表的同血漿増地マウス株はBalb/cである。上述の方法で生産したモノクローナル抗体組成物は、例えば、h u T F h 含有免疫反応の形成が必要である、診断及び治療法で用いることができる。

1. ハイブリドーマ

本発明のハイブリドーマは、h u T F h と免疫反応する抗体分子を生産することを特徴とする。さらに、好ましいハイブリドーマは、h u T F h で開始する複製を阻害し、また、望ましくは、本発明のポリペプチド、好ましくは、h u T F h 結合部位ポリペプチド類似物、そしてさらに好ましくは、第1表に示されているポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産することを特徴としている。さらに好ましい態様においては、抗腫瘍MoAbは、非ヒト、霊長類、T_H1と免疫反応する。

他の好ましい態様において、本発明のハイブリドーマはh u T F h 及びh u T F h : 因子Ⅳ/Ⅴaの複合体と免疫反応し、h u T F h

Ⅴa複合体形成速度の減少によると考えられている。従って、生体内において、h u T F h 因子Ⅳ/Ⅴa結合部位ポリペプチド類似物の投与は、凝集やある免疫反応のような、組織因子の因子Ⅳ/Ⅴaへの結合により開始する生理学的応答を調節するのに用いることができる。好ましい態様において、このポリペプチドは、先に述べたように、リン脂質中に分散して投与される。

生体内における組織因子による因子Ⅳ/Ⅴaの結合を調節する他の方法は、本発明の抗体組成物 (抗ポリペプチド抗体) 又は抗凝集MoAbの効果を静脈注射により投与することである。この抗体分子は、パラトビック領域を含み、かつイムノグロブリン分断片F(ab')₂、Fab及びそれに類するもののような、Fc領域を含まないものである。治療的に効果的な抗凝集MoAbは、体重kg当たり150µgから5mg、好ましくは体重kg当たり、約100µgから約1mg、より好ましくは、体重kg当たり約150µgから約500µgの範囲である。

他の態様において、本発明のMoAb、抗凝集MoAb又は非中和性MoAbの抗体分子を抗腫瘍試験に結合し、抗腫瘍治療組成物が作られる。このようにして作った、効果的な抗腫瘍治療組成物を、その表面に組織因子を発現する腫瘍細胞を有する被検者に投与することができる。このような腫瘍細胞の代表例は、肉及び肺のがん細胞である。

ここで考案された抗腫瘍試験の代表例には¹²⁵I、¹¹¹In、⁹⁰Y及びこれに類するもののような放射性核種がある。放射性核種結合モノクローナル抗体治療組成物の製造法及びその使用法は、コザック (Kozak) 等 (トレンズ・イン・バイオテクノロジー (Trends in Biotech.) 4巻、259~264頁 (1986年)) により報告されている。

により開始する凝集を中和する抗体分子を生産する。さらに、h u T F h : 因子Ⅳ/Ⅴaの複合体と免疫反応するハイブリドーマ生産抗体は、該抗体の、h u T F h ポリペプチドp1-30又はp26-49、好ましくはその両方と免疫反応し、かつ、より好ましくは、該抗体分子が、ポリh u T F h ポリペプチドp56-71とは免疫反応を起こさないことを特徴としている。

望ましい免疫特異性を有する、すなわち、特別なタンパク質として、またはポリペプチドと免疫反応する抗体分子を生産する (分泌する) ハイブリドーマの作成法は、当分野ではよく知られている。特に、ニマン (Niman) 等により報告されたハイブリドーマ技術は (プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、80巻、4949~4953頁 (1983年))、有用である。好ましいハイブリドーマを、例13の第5表に示した。

ハイブリドーマ培養物T F 8-5 C 9、T F 9-6 B 4及びT F 9-10 H 10はブタベスト協定に従い、1987年3月27日ATCCに保管され、各々受理番号、HB9382、HB9381及びHB9383が割当てられた。

2. 治療方法及び組成物

本発明のh u T F h 因子Ⅳ/Ⅴaの結合部位ポリペプチド類似物、抗体組成物、モノクローナル抗体組成物及び抗凝集MoAbは各々、生体内において、組織因子による因子Ⅳ/Ⅴaの結合を調節するのに用いることができる。

例えば、h u T F h 因子Ⅳ/Ⅴaの結合部位ポリペプチド類似物は、効果量を被検者に投与したとき、因子Ⅳ/Ⅴaの組織因子への結合を競争的に阻害することができる。医療的に許容しうる組成物に用いることができる。この阻害は、組織因子-因子Ⅳ/

投与されたポリペプチド又は抗体分子含有組成物は、溶液又はサスペンションの形をしているが、ポリペプチドは、錠剤、丸剤、カプセル、放出持続製剤又は粉末の形もとる。どの場合にも、この組成物は、0.10%~95%、好ましくは、25%~70%の活性成分を含んでいる。

活性成分としてポリペプチド又は抗体分子を含む治療組成物の調製は、この分野ではよく知られている。典型的には、このような組成物は、液体溶液又はサスペンションのような注射可能な形に調製されるが、注射前の液体溶液又はサスペンションを作るのに適している固形剤としても調製される。またこの調製物はエマルジョン化されることもある。この活性治療成分は、しばしば、医療的に許容でき、かつ、活性成分に適合する賦形剤と混合する。例えば、典型的賦形剤としては、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール又はそれらに類するもの及びこれらの組合せたものがある。加えて、もし、望ましいなら、この組成分は、加湿剤又はエマルジョン化剤、pH緩衝剤のような、活性成分の効果を促進する補助物質を少量含ませることも可能である。

ポリペプチド又は抗体分子組成物は、中和した経皮的に受容しうる塩の形に調整することもできる。医療的に受容しうる塩には、酸付加塩 (ポリペプチド又は抗体分子の遊離しているアミノ基で形成される) 及び、例えば、塩酸又はリン酸のような無機酸又は、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸及びこれらに類するもので形成されるものがある。遊離したカルボキシル基で形成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は鉄の水酸化物のような無機塩基及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン及びこれらに類するもののような有機塩基か

平成 7.12.20 発行

とサンプルの相対量、試薬/サンプル混合物の維持時間、温度、パッファ条件及びそれに類するもののような、少なくとも1回の検定法のパラメーターを明確に記述してある。

好ましい態様において、さらに、本発明の診断システムは、試薬を含む複合体の形成を知らせるラベル又は指示手段を含んでいる。

ここで用いられているように、種々の文法型の“ラベル”及び“指示手段”は、複合体の存在を示す検出可能な信号を産み出すのに直接又は間接的に関連する単一の原子及び分子を意味する。“生体内”ラベル又は指示手段とは、被検者の体内で有用なものである。どのラベル又は指示手段も、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物の一部である抗体分子、発現したタンパク質、又はポリペプチドに結合又は超込まれていることもあるし、また別々に使用されることもあり、また、これらの原子又は分子は付加的試薬と結合して、又は単独で使用される。このようなラベルは、臨床的診断化学においては、よく知られているものであり、それらが、他の新しいタンパク質、方法、そして、又はシステムとともに使用されるときに限り、本発明の一部を構成する。

ラベルの結合、すなわち、ポリペプチド及びタンパク質のラベル化は、当分野ではよく知られている。例えば、ハイブリドーマによって生産される抗体分子は、培養培地中の成分として与えられたとき、放射性同位元素含有アミノ酸の代謝的取込みによるラベル化が可能である。例えば、ガルフレ (Galfre) 等の、メソズ・イン・エンザイモロジー (Meth. Enzymol.) 73巻、3～46頁 (1981年) 参照。活性化官能基を介するタンパク質の結合又はカップリング技術は特に有用である。例えば、オーラマス (Oramas) 等の、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ

第22章及び米国特許第3,654,090号、第3,850,752号及び第4,016,043号に報告されている。

このように、好ましい態様において、本発明の発現したタンパク質、ポリペプチド又は抗体は固相マトリックスに固定され、この診断システム中に、分包されている固体サポートを形作っている。

典型的に、この試薬の固体マトリックスの固定は、他の固定法もあるが、この分野でよく知られている水性媒体からの吸着が用いられている。

有用な固体マトリックスは、当分野でよく知られている。このような物質には、フェルマシア・ファイン・ケミカルズ社 (NJ州、ビスカタウェイ) から、セファデックスという登録商標で市販されている、微細デキストラン；アガロース；11州、北シカゴ、アボット・ラボラトリーズ社から市販されている直径約1ミクロン～約5ミリメートルのポリスチレンビーズ；シート状、ヒモ状又はへら状のポリ塩化ビニルポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロース又はナイロンベースの織物、又は、ポリスチレン又はポリ塩化ビニルでできているチューブ、プレート又はマイクロプレートのウェルが含まれる。

ここで述べられている診断システムの試薬、ラベル化結合試薬又は、増巾試薬は、液体分散物として溶液として、又は、例えば、凍結乾燥型のような、実質的に乾燥粉として提供される。指示手段が試薬である場合、この試薬基質も、システムの別の包むに提供される。先に述べた、マイクロプレートのような固体サポート及び1つ以上のパッファも、この診断検定システム中に別にパッケージされた要素として含まれている。

診断システムに関連して、ここで議論されているパッケージは、

ら誘導される。

治療用のポリペプチド又は抗体分子含有組成物は例えば、単位投与量の注射によるように、局所的に又は静脈注射により簡便に投与される。

本発明の治療組成物に対して用いられる“単位投与”という語句は、ヒトに1回投与するのに適した、必要とされる量、すなわち、キャリアー又はビヒクルと共に、望ましい治療効果をもたらすために計算された、予め決められた量の活性物質を含む、物理的に分離されている単位を意味する。

診断組成物は、投与物形状に適した方法で、治療的に効果的な量が投与される。投与される量は処置される機体、活性成分を利用する機体の血液循環システムの容量及び望ましい組織因子結合能の阻害又は中和度に依存する。投与される必要のある活性成分の精密な量は、医師の診断に依存し、かつ、各個人によっても異なる。しかし、適当なポリペプチド投与範囲は、1日に、患者当たり、1から5ミリグラムの活性物質というオーダーであり、投与の正確に依存する。第1回投与及び二次免疫の適正な治療計画もいろいろであるが、典型的には、一次投与後、1時間以上の間隔をおいて、さらに注射又は他の方法による投与が繰り返される。別に、血液中、10ナノモル濃度から10マイクロモル濃度を維持するのに十分な、持続的静脈注入も考慮されている。

1. 診断システム

本発明のキット型の診断システムは、少なくとも1回の検定に十分な量の、分包試薬として、本発明の発現タンパク質ポリペプチド、抗体組成物又はモノクローナル抗体組成物を含んでいる。また、この分包試薬の使用説明書も含まれているのが普通である。典型的に、“使用説明書”には、試薬濃度には、混合する試薬

イムノロジー (Scand. J. Immunol.) 8巻、補版7巻、7～23頁 (1978年)、ロッドウェル (Rodwell) 等の、バイオテクノロジー (Biotech.)、3巻、889～894頁 (1984年) 及び米国特許第4,493,795号参照。

また、診断システムは、好ましくは分包の、特異的試薬を含む。“特異的結合試薬”は、本発明の試薬を選択的に結合できる分子であるが、本発明のタンパク質発現産物、ポリペプチド又は抗体分子そのものではない。代表的な特異的結合試薬は、抗体分子、補体タンパク質又はその断片、タンパク質A、血液凝固因子Ⅴ/VⅡ、子ウシ組織因子及びそれに類するものがある。この特異的結合試薬は、反応物が複合体の一部として存在するとき、これと結合することが望ましい。

好ましい態様において、特異的結合試薬はラベル化される。しかし、その診断システムが、ラベル化されていない特異的結合試薬を含むとき、典型的には、この試薬は、増巾手段又は試薬として用いられる。これらの態様において、このラベル化した特異的結合試薬は、この増巾手段が、反応複合体に結合しているとき、この増巾手段に特異的に結合することができる。

本発明の診断キットは、血清、血漿又は尿のような体液サンプル中のh u t f hの存在又は量を検出するのに“イライザ”方式で用いることができる。“イライザ法”は、サンプル中に存在する抗原又は抗体量を検出及び定量するための、固相に結合した抗体又は抗原及び酵素-抗原又は酵素-抗体複合物を用いた、酵素結合免疫吸着検定法のことである。イライザ法の説明は、全て参考としてここに記述されている。1982年、C A州ロサンゼルスラング・メディカル・パブリケーションから出版された、D. P. サイツ (Sittes) 等の基本的及び臨床的免疫学、第4版、

平成 7.12.20 発行

は該システムにおいて通常使われるものである。このようなパッケージには、ガラス及びプラスチック製の（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン及びポリカーボネート）ボトル、バイアル、プラスチック及びプラスチックホイルでラミネートした外袋物及びこれらに類するものが含まれている。

B. 検定法

本発明は、本発明の抗体又はモノクローナル抗体組成物に含まれている、発現されたタンパク質、ポリペプチド又は抗体分子を含む複合体を生産することによりh u T F hを検出する方法を考案した。当業者には、これらの複合体を形成するのに利用できる多くの、よく知られている臨床的診断の化学手段があることが理解できよう。従って、典型的検定方法がここで説明されているが、これは、本発明を制限するものではない。

1. 血栓検出

被検者中に存在する血栓検出法が考案された。生体内での指示手段と結合する抗体を含む本発明の、効果的量のモノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈注射する。好ましい態様において、ラベル化した抗体は、h u T F h及び第1及び第2量のポリペプチドと免疫反応するがp 204~226とは反応しないもので、好ましくはハイブリドマTF8-5C9、TF9-6B4又はTF9-10H10から生産されたものである。

それから被検者を、ラベル化した抗体分子が、血栓の一部に存在するh u T F hと反応し、複合体を作るのに十分な決められた時間、及び、好ましくは、未反応の抗体分子が体内から掃き除されるのに十分な付加的期間維持する。その後、被検者を、生成した複合体の存否及び好ましくはその位置について検定する。

2. 身体サンプル中のh u T F hの検出

ートした。

その後、残留組織固体を各々、その固体をヘプタン：ブタノール（2：1）25ミリリットル（mL）当り、組織固体1gの割合で、ヘプタン：ブタノール（2：1）と混合することによって行う5回の抽出を行ない、ついで濾過により、その固体を回収する。最後の濾過後、残留組織固体を再び大気圧下、約20で一晩で乾燥し、脱脂組織粉末を作り、必要になるまで、-80で保存する。

つづいて、組織粉末25グラムをTS/EDTAバッファ（100ミリモル濃度（mM）NaCl、50mMトリス・塩酸（pH 7.5）、0.02%アジ化ナトリウム、5mMエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、0.1%（V/V）トリトンX-100（ポリアリルエチレン-9-オクチルフェニルエーテル）500mLと混合し、ついで4で一晩攪拌する。さらにこの混合物を15,300×gで1時間遠心する。生じたペレットを500mLのバッファA（100mM NaCl、50mMトリス・塩酸（pH 7.5）、0.02%アジ化ナトリウム、2%トリトンX-100）に再懸濁し、スラリーを作る。室温で1時間の攪拌後、このスラリーを上述のように遠心する。生じた上清を回収し、凍結乾燥した後、100mLのバッファAに溶かして、h u T F h含有抽出液を作る。

2. h u T F hの凝集活性を測定するための凝集検定法

h u T F hプロコアグラント活性を、37で維持した、全試薬及び混合物を用いて行う、1段階凝集検定法で測定した。血漿と同容積の、20mMクエン酸ナトリウム2水和物及び140mM NaCl（pH 7.4）を含む溶液を混合することにより、正常なヒト血漿をクエン酸化した。TBS/BSA溶液（150mM NaCl、

身体サンプル、好ましくは体液サンプル中のh u T F hの存在、及び好ましくはその量を検出するため、凝集的又は非凝集的な、種々の不均一及び均一検定法が利用される。例えば、液体体液サンプルと、ラベル化したp 26-49を、マイクロプレートのウェルの内壁に固定した、ハイブリドマTF8-5C9又はTF9-10H10から生産された抗体分子を含む固体サポートと混合し、固相相免疫反応混合物を作る。この混合物をサンプル中に存在するh u T F h及びラベル化したp 26-49が、固体サポートとして存在する抗体分子への結合を競争し、固相免疫反応物を形成するのに十分な時間、生物学的検定条件下に維持する。未結合のラベル化p 26-49を、免疫反応物から取り除く。その後、免疫反応物として結合したラベル化p 26-49の量を測定し、その差により、h u T F hの存在を検定できる。

例

次に示す例は、本発明の説明を意図したもので、これを制限するものではない。

1. 組織因子含有ヒト脳抽出物の調製

生検で得られた正常なヒトの脳を12時間以内に処理するからしくは、-80で保存する。その髄膜及び大脳を除き、ついで残存する脳部分を、ポリロンホモジナイザー（NY、ウェストバリー、プリンクマン、インストラメント社）を用いて、等容量の冷（0で）アセトン中でホモジネートした。このホモジネートしたものをさらに3倍容の冷アセトンと混合し、その組織固体部分を、凍結ガラスポートを用いて濾過して回収した。各々7回の2倍容の冷アセトンとの混合及び引きつづき濾過により、残留固体からアセトン可溶性物質を抽出した。最後の濾過の後、残存するアセトンを、20で、一晩、残留固体から大気圧下でエバポレ

50mMトリス・HCl（pH 7.5）、0.1%子ウシ血清アルブミン）で希釈したh u T F hを含むサンプル100マイクロリットルを、100mLのクエン酸化血漿と混合した。25mM CaCl₂溶液100mLを混合し、凝集反応混合物を作り、凝集が始まるまでゆっくりと揺らした。CaCl₂の添加と、凝集形成の間の時間を測定した。それから、h u T F h活性の標準曲線を、秒で示した凝集時間と希釈率をプロットすることにより作った。代表的標準曲線を第3図に示した。

3. h u T F hの親和性単離のための、因子V含有固体サポートの調製

ヒトの因子V/V_aを参考文献として記述されている、フェア（Fair）の報告（ブラッド（Blood）、62巻、784~91頁（1983年））に従って単離した。この単離した因子V/V_aを、アガロース固体マトリックスに結合するため、4で一晩、その5ミリグラム（mg）を、0.1M 2-（N-モルホリノ）エクススルホン酸（MES）（pH 6.5）に対して透析した。塩化カルシウムを最終濃度1mMとなるように添加した。それから因子V/V_aを4mLのアファゲル-15活性化アガロースビーズ（CA州、リッチモンド、バイオラフ・ラボラトリーズ社）と混合し、生じた結合反応混合物を、製造業者が推薦するもの（バイオラフ）に従って4で、4時間の回転処理を行った。

固体サポート上の過剰タンパク質結合部位を、その固体サポートを、0.1Mグリシンエチルエステル中、室温で1時間攪拌することにより、ブロックした。その後、この固体サポートを、凍結ガラスポート上各約20mLのIIIバッファA、0.1M NaCl含有バッファA、0.5mM EDTA含有バッファA及び0.1M CaCl₂含有バッファAをこの順序で用いて洗浄した。それから

ら過剰の液体を減圧下で除去、半乾濕状の粒子物質（ケーキ）を作った。

4. h u T F の因子 η/η_0 = 親和性による単離

0.1 M のグリシンエチルエステル及び 0.1 M MES (pH 6.5) を含む 2.0 ml の溶液を、2.5 ml のアフィゲル-15 アガロースビーズ（バイオラフ）と混合し、結合反応混合物を作る。この結合反応混合物を室温に 1 時間維持する。この生成した結合物を、焼結ガラスロート上、10 倍容のバッファを用い、減圧下で透過することにより洗浄し、グリシンエチルエステル-アガロースケーキを作る。

例 1 で調製した 3.0 ml の抽出溶液を、1 M 塩化カルシウムを含む 5 リットルのバッファ A に対し、4℃、1 晩透析を行う。透析した抽出物を、グリシンエチルエステル-アガロースケーキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら室温で 2 時間維持した後、この固液相を焼結ガラスロートを用いて透過することによって分離する。この液相を回収し、最終濃度 $\mu\text{g/ml}$ 当り 10 ユニットとなるようにトラシロール（MO 州、セントルイス、シグマケミカル社、アプロチニン）と混合する。この回収した液相を例 3 で調製した因子 η/η_0 / アガロースケーキと混合し、第 2 の固/液相混合物を作る。

この混合物を回転しながら、一晩 4℃ に維持し、h u T F - 因子 η/η_0 を含有固相産物を形成させる。その後、この固相及び液相を先に述べたように透過により分離する。焼結ガラスロート上に残留する固相を 1 M 塩化カルシウムを含むバッファ A 2.5 ml で洗浄した。さらに、この固相を焼結ガラスクロマトグラフィーカラム (0.5 x 15 cm, バイオラフ) に移し、6 ml の同洗浄バッファで洗浄した。上記の洗浄後、この固体サポートに結合

h u T F を、10 分の 1 容の T F 8-5 G 9 又は P A b 100 (ATCC-TIB 115; ここでネガティブコントロールとして用いられている SV 40 ラージ T 抗原特異的抗体を生産するハイブリドーマ) ハイブリドーマ培養上清とともに、4℃ で 1 晩インキュベートすることにより免疫沈殿化を行った。アガロースビーズ (MO 州、セントルイス、シグマケミカル社) 上に固定したヤギの抗マウス IgG を、その 1 次免疫反応産物を吸収するのに用いた。このビーズを同バッファでよく洗浄し、結合した ^{125}I -h u T F を、DTT 存在下又は非存在下、同バッファ中で 5 分間煮沸することにより溶出した。SDS-PAGE 後、タンパク質バンドはオートフルオログラフィーで可視化した。

単離した h u T F を放射線ヨウ素化し、DTT で還元し、ついで 10% アクリルアミドゲルで SDS-PAGE 分析したとき、47 kDa の見かけの分子量をもつ単一のメインバンドが観察された (第 4 図)。しかし、未還元 h u T F を同様に分析した場合は、およそ 58 kDa 及び 47 kDa の 2 つのバンドが相対的に等しい量で観察され (第 5 図 レーン B)、このことは、少なくとも 2 つの異なる大きさのものの存在を示している。

非還元で観察されるこの 2 つのバンドに対する説明としては、その大きな方、すなわち、泳動が遅いバンドは、非常に多くのグリコシル化を受けたものか、付加的なプロセッシングを受けていないタンパク質を有しているのか、又は、付加的な、ジスルフィド結合で結合したポリペプチドと会合しているのかもしれないというものである。還元後の単一バンドの存在は、はじめの 2 つの示唆と一致している。その後者の可能性は中でも一番大きいように思えるが、その小さいサイズの差のために、付加的ポリペプチドは、色素の場所又はその付近に泳動するよう十分小さいも

した h u T F を、焼結ガラスカラム上に保持されている固体サポートを 5 mM の EDTA を含むバッファ A で洗浄することにより、遊離 (溶出) させる。溶出した物質を 1 ml 面分つ回収し、各面分について、例 2 で述べた方法により、h u T F の存在を検定した。h u T F 含有面分を認め、4℃ で、1% トリトン X-100 を含む 5 リットルの TBS (150 mM NaCl、150 mM トリス塩酸、pH 7.5) に対して 1 晩透析した。

このようにして作った透析物をついて、4 倍容の冷アセトンと混合し、h u T F タンパク質を沈殿した。この沈殿をおよそ 10℃、5000 x g、30 分間の遠心で集めた。生成したペレットを真空雰囲気下で乾燥した。典型的な収量は、脱脂した乾燥粉末 1 グラム (乾燥重量) 当り、2 μg の h u T F であった。

このようにして生じた単離 h u T F サンプルを TBS/トリトン中に懸濁し、ついで、製造業者の指示に従い (IL、ロックフォード、ピラスケミカル社)、ヨーゲンを用い、Na¹²⁵I でラベル化した (IL 州、アーリントンハイフ、アマーシャム社、マイクログラム当り 16 マイクロキュリー)。ラベル化後、過剰の未反応 ^{125}I を TBS/トリトンを用いたセファデックス G25 (NJI、ピスカタウィ、ファルマシア社) での脱塩クロマトグラフィーにより、ラベル化した h u T F から分離した。

^{125}I ラベル化 h u T F 含有サンプルのラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による (SDS-PAGE) 評価は、レムリ (Lucanli) (ネイチャー (Nature)、227 巻、680~685 頁 (1970 年)) の方法に従った。還元条件下で評価するサンプルに対しては、100 mM のジチオスレイトールを、サンプルバッファ中に含有させた。1% トリトン X-100、50 mM トリス塩酸 (pH 7.4)、150 mM NaCl 中の ^{125}I

のらしく、還元後、10% アクリルアミドでは分離されないであろう。15% のポリアクリルアミドゲルの還元及び非還元 h u T F の電気泳動は、単一の分離した軽鎖を示すには失敗したが、いくつかの少量の、速く泳動するバンドが観察された (第 5 図、レーン A 及び B)。これらの小さい、少量のポリペプチドは、以前に報告されているように (ブローズ (Broze)) 等、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、260 巻、10917~10920 頁 (1985 年) 及び ゲハ (Geba)、ブローディング・インターナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、83 巻、299~302 頁 (1986 年))、汚染物を示している。この可能性を明らかにするため、47 kDa 及び 58 kDa のバンドは非還元ゲルから切り出され、その各々を、ジチオスレイトールで還元し、その各々を、15% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にかけた (第 6 図、レーン C 及び D)。58 kDa タンパク質は 1.25 kDa 軽鎖及び 47 kDa 重鎖であると分った。47 kDa のタンパク質を分析したとき、同分子量の重鎖のみが観察された。このように、両者は、SDS-PAGE で同様の挙動をもつ重鎖を保有していた。

直接軽鎖の存在を示すため、 ^{125}I -h u T F を、h u T F 特異的モノクローナル抗体 T F 8-5 G 9 で免疫沈殿化し、それを還元剤存在下の電気泳動にかけた。主要な 47 kDa バンドがおよそ、1.25 kDa の分離したバンドとともに観察された (第 6 図、レーン A)。還元化しないサンプルの電気泳動でおよそ 47 kDa 及び 58 kDa のバンドを生じたが、低い分子量のポリペプチドは生じなかった (第 6 図、レーン B)。また非還元 h u T F の電気泳動は、ブローズ (Broze) 等 (ジャーナル・オブ・バイオ

ロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 260巻:10917-20頁 (1985年)) により示唆されている h u T F 重鎖のダイマーと一致する、少量の90kDaタンパク質も示した。

h u T F 軽鎖が重鎖からタンパク質の分解によって生ずるといふ可能性を研究するため、SDS-PAGEにより単離した軽鎖及び重鎖を、N末端アミノ酸配列分析にかけた。

重鎖及び軽鎖をSDS-PAGEで分離し、アバーソールド (Abersold) 等の高 pH 注 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 261巻:4225-4238頁 (1986年)) を用い、活性化した、アミノ酸置換ファイバーストラスフィルター上に電気ブロットした。このタンパク質バンドを、蛍光染料 (アバーソールド (Abersold) 等、上記) により、このブロットを可視化し、切り出し、そして、まだファイバーストラスに結合したまま、PTH誘導体のオン・ライン HPLC 分析を用いたアプライド・バイオシステムズ 470A タンパク質シーケンサーで配列決定した。別にタンパク質バンドをコマージ・ブルーによる染色によりゲルを可視化し、シーケンシングのために、電気溶出した。両方法とも等しい結果を与えた。

h u T F 重鎖のマイクロシーケンシングは、ほぼ等モル量のアミノ酸配列で一致した結果となった。ほとんど全ての場合、各アミノ酸残基は2サイクル経て、2度出現する。これは、長さがN末端で2残基異なる h u T F 重鎖の2つのバリエーションがねじれたN末端をもつことの明白な証拠である。大きい方のバリエーションのN末端は、非特定のアミノ酸Xを含む

Ser-Gly-X-X-Asn-Thr-Val-Ala-Ala-Tyr-X-Leu-Thr-Trp-Lys-ser
であることが誘導された。

軽鎖の配列決定するいくつかの試みは、ブロックされたN末端

タンパク質染色によって、金合した小ポリペプチド鎖を抽出することは困難である。

イン・ビトロでは、単量体 h u T F が凝集を開始するにもかかわらず、h u T F による凝集の生理的開始は、細胞表面で起こる。軽鎖は、直接的凝集決定法で抽出することができ、h u T F 凝集又は機構において重要な役割をはたしていることが推察できるであろう。例えば、軽鎖は、因子Ⅶ/Ⅹの組織因子への結合の正の協同性を説明すると仮定されている。因子Ⅶに対する2つのサブユニットレセプターのアセンブリーに関与している可能性がある。別に、細胞表面上の構造ドメインでの h u T F の機構及び、細胞表面上での h u T F 活性の制御は、h u T F 軽鎖に付与されるのかもしれない。

N結合オリゴ糖の役割は、¹²⁵I-h u T F サンプルの脱グリコシル化により試験した。毎分およそ 3.6×10^5 カウントを含む、ラベル化 h u T F 約 1274 ナノグラムを 0.4 ユニットのグリコペプチダーゼ F (1N州、インディアナポリス、ペーリンガー、マンハイム・バイオケミカル社)、20mM トリス塩酸 (pH 7.5)、10mM EDTA、及び 1% トリトン X-100 を含む 20mM の溶液と混合し、37℃ に 16 時間維持した。それから、この脱グリコシル化した産物を、先に述べた SDS-PAGE で分析した。

第7図、レーン4及び5に示した、脱グリコシル化の研究結果は、58kDa の h u T F は、別のタンパク質部分、すなわち軽鎖の存在のため、47kDa のものよりも、高い相対分子量を示すことを表わしている。

このようにして単離した h u T F を、再脂質化し、そのプロコアグラント活性が再構成された。最高の活性を有する再脂質化組

と一致して、なんら配列の情報を与えなかった。しかし、h u T F の重鎖及び軽鎖は、単離された h u T F に対して生じた、2つのウサギの抗 h u T F 抗血清及び28個の、マウスモノクローナル抗体の全てが、重鎖のみに結合することが分かっていることから、抗原的に全く別のものである。それゆえ、軽鎖は、重鎖のタンパク質分解断片とは考えにくい。さらに軽鎖は、ベクター、ミクログロブリンに対する抗血清とは反応しなかった。

現在、125kDa の h u T F 軽鎖の意味は知られていない。それは、単一の、独立した分子種なので、ランダムなジスルフィド交換による、単離の際にアーティファクトとして誘導されたものでもないようだ。還元なしに、酸和性による単離を行った h u T F を SDS-PAGE にかけてとき、h u T F 活性は、58kDa と 47kDa の分子量に対応するゲルから溶出した。これら2つの分子量に対応する h u T F 活性も、粗画又は部分的に単離した胎盤の抽出物を、SDSゲルの電気泳動にかけたとき (データ示さず) も検出された。全ての場合において、その活性は、因子Ⅶ依存で、このことは、h u T F 特異的活性を示している。これらの知見は、h u T F のみが因子Ⅶを活性化でき、かつ、軽鎖はこの機能に必要なことを示している。

軽鎖が h u T F 重鎖のおよそ半分のみにジスルフィド結合していることは興味深い。生体内で、h u T F の重要な領域に不在なのか、存在するののかとは別に、界面活性剤で分解される、非共有相互作用を介して金合しているのであろう。軽鎖は、サイズが小さく、SDS-PAGEの際にマーカー色素の部分に泳動してしまうため、また、h u T F の報告されている分析例が還元後行なわれていることから、初期の研究では気づけなかった。現行の酸和性を用いた方法で単離することができる制限された量では、

成因子産物を提供するのに必要な組織因子: 脂質比が、0.1% BSAを含む HBS バッファ溶液 (20mM ヘプス、pH 6.0、140mM NaCl、0.01% アジ化ナトリウム) 中、種々の濃度となるように、上述の得られた単離 h u T F を溶かすことにより実験的に測定された。それから、種々の h u T F 希釈物を以下に述べるように再脂質化し、さらに、例2で報告されている凝集決定法で測定された、最も高い活性を示す比が、後の使用のために準備された。

h u T F の再脂質化のための脂質は、MO州、セントルイス、シグマケミカル社から入手できるウサギの脳アセトン抽出粉末から抽出することにより調製した。この粉末を、粉末1gに対し、25mL のヘプタン:ブタノール (2:1、v/v) の割合でヘプタン:ブタノールと混合し、ついでこれに含まれる固体を焼結ガラスロートを用いた濾過により回収した。残留固体について、この抽出を6回くり返した。さらに、この残留固体をロート・エバポレーションで乾燥し、クロロホルムで溶解後、-80℃ に保存した。必要なときに、そのクロロホルムに溶解した固体を窒素雰囲気下で乾燥し、新しく調製した 0.25% のデオキシコール酸ナトリウム溶液中、4mg/mL となるように溶解し、ウサギ筋リン脂質溶液 (PBPL) を作った。

再脂質化には、各 h u T F 希釈物 100μL を、100μL の RBPL 溶液、0.76mL の 1% ウサギ血清アルブミンを含む HBS 溶液 (HBS/BSA) 及び 40μL の 100mM 塩化カルシウムと混合する。この混合物を2時間、37℃ に維持し、ついで、ここに含まれる h u T F 活性を、例2で述べた凝集決定法で測定した。

5. ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の作成

全てのハイブリドーマは、6~8週間の年令の、スクリアス・クリニック・アンド・リサーチ・インスティテュート、動物飼育場から入手できるメスの $\beta_2\text{m}^b/c$ マウス由来の脾臓細胞を用いて作成された。

a. マウスTF8の免疫化

例4で調製した親和性単離化 $\text{h}\mu\text{TF}5$ マイクログラムを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう生理食塩水に溶かし、MO州ハミルトンのリビ・イム/ケム・リサーチ社から入手したR-700アジュバントと1:1の割合で混ぜ、エマルジョン化した。ついで、このエマルジョンをマウスTF8に皮下注射した。

このマウスTF8は同様に、約2週間後、変性 $\text{h}\mu\text{TF}$ 及びR-700アジュバントを含むエマルジョンの接種を受けた。変性 $\text{h}\mu\text{TF}$ は、0.09%トリトンX-100、0.93%SDS、0.2M-2-メルカプトエタノール及び $270\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\text{h}\mu\text{TF}$ を含むTBS (150mM CaCl_2 、50mM トリス-HCl、(pH 7.5)を、5分間煮沸して調製した。その後、この変性した $\text{h}\mu\text{TF}$ を、等容量の、0.6%のマウス血清アルブミンを含む生理食塩水と混合した。つづいて、4倍容のアセトンで、この変性 $\text{h}\mu\text{TF}$ 溶液に混ぜ、生じた混合物を、一晩、 -20°C に保った。生じた沈殿を約 $13000\times\text{g}$ 、10分間の遠心で集め、4:1 (v/v) のアセトン:水で一度洗浄してから、 $0.1\text{mg}/\text{ml}$ の濃度となるよう、 $200\mu\text{g}$ の生理食塩水で懸濁した。

最初の注射から、約4週間後、 0.1mg の生理食塩水中 $33\mu\text{B}$ の親和性単離化 $\text{h}\mu\text{TF}$ を、 0.1mg の完全フロイント・アジュバント (cFA) と混合し、エマルジョンを作り、これをマウスTF8に腹腔内注射をした。

最初の接種から8週間後、リン酸緩衝食塩水中 $15\mu\text{g}$ の親和

性 $\text{h}\mu\text{TF}$ をイムロン・96穴フレキシブル・ピニルマイクロプレートのウェルに入れた。それからこのプレートを、1時間、 37°C で維持し、 1gG をウェルの壁に吸着させた。TBSで3回洗浄した後、3%オバルミンを含む $100\mu\text{B}$ のTBS/トリトンを各ウェルに入れ、過剰のタンパク質結合部位をブロックした。

ウェルを、1時間、約 20°C に維持したのち、そのブロッキング溶液を、アスピレータで除いた。そして、各ウェルに $50\mu\text{B}$ のハイブリドーマ培養上清を加えた。できた固液相免疫反応混合物を1時間、 37°C に維持した。その後ウェルをTBSで3回洗浄し、過剰の液は、アスピレータで除いた。

例4で調製した、TBS/トリトン中、およそ 1mg の $\text{h}\mu\text{TF}$ と、およそ $5\times 10^5\text{cpm}$ を含む、 $50\mu\text{B}$ の ^{125}I ラベル化 $\text{h}\mu\text{TF}$ を各ウェルに入れ、第2の固液相免疫反応混合物を作った。そのウェルをTBS/トリトンで3回洗浄し、固相に結合した ^{125}I - $\text{h}\mu\text{TF}$ 含有免疫反応産物を単離した。過剰の液体はアスピレータで除き、ウェルを乾燥させた。個々のウェルを切り取り、各ウェルに含まれる ^{125}I を、ガンマカウンタで計数した。

バックグラウンド放射活性 ($\text{h}\mu\text{TF}$ と抗体の反応無しの場合) はウェル当たり、平均約 $200\sim 300\text{cpm}$ であったが、一方、 $\text{h}\mu\text{TF}$ と抗体の反応が有る場合は、ウェル当たり 10000cpm のカウントがある。抗 $\text{h}\mu\text{TF}$ 抗体の生産が正と検定されたハイブリドーマを選択し、本発明のハイブリドーマとした。つづいて、これらのハイブリドーマを、以下に述べるドット・プロット検定でスクリーニングした。

b. ドット・プロット・イライザ法

例4で調製した、アセトン沈殿した $\text{h}\mu\text{TF}$ を、4:1 (v/v)

性単離化 $\text{h}\mu\text{TF}$ を静脈注射 (i.v.) し、同じ $\text{h}\mu\text{TF}/\text{PBS}$ 接種を24時間後にも行った。そのマウスTF8の脾臓細胞を融合のため3日後に採取した。

b. マウスTF9の免疫化

マウスTF9は、2回のリビ・アジュバント注射に、エマルジョン化前に変性した $\text{h}\mu\text{TF}$ を用いること以外は、マウスTF8と同じ接種スケジュールがほとんどこされた。さらに、第1回目のPBS接種の腹腔内注射をcFA含有接種後4ヶ月半後に行なった。

c. ハイブリドーマの作成

TF8及びTF9由来の脾臓細胞に、同じ融合操作を行った。各マウス由来の脾臓細胞約 1×10^6 個を、30%ポリエチレングリコール (PEG 4000、ATCC 25322-68-3) を含む $200\mu\text{B}$ の融合媒体中、 2×10^5 のP3X63Ag

8.653.1ミエローマ細胞と混合した。細胞融合後、生じたハイブリドーマを96穴プレートに接種し、HAT培地 (ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン) 中で培養し、つづいて、 $\text{h}\mu\text{TF}$ と反応する抗体分子生産能でスクリーニングした。

両マウスTF8及びTF9脾臓細胞由来の融合体共、HAT融合媒体耐性ハイブリドーマ細胞クローンを生じた。TF8融合体は907個のHAT耐性ハイブリドーマを、一方TF9融合体は、348個のHAT耐性ハイブリドーマを生じた。

5. 抗 $\text{h}\mu\text{TF}$ 抗体分子の生産によるハイブリドーマのスクリーニング

a. 固相RIA

TBS中、 $20\mu\text{B}/\text{ml}$ に溶解した $100\mu\text{B}$ のヤギ抗マウスIgG (IN州、インデアナポリス、ペーリンガー・マンハイ

のアセトン:水溶液で抽出した。残存する沈殿をTBS中に $20\mu\text{B}/\text{ml}$ となるように懸濁した。この $\text{h}\mu\text{TF}$ 溶液 $20\mu\text{B}$ ($1\mu\text{B}$) を、消えないインクで、BA83ニトロセルロース紙 (シュレイチャー・アンド・シュエル、NH州、キーン) 上に書いた数字の隣にスポットする。スポットした $\text{h}\mu\text{TF}$ を空気乾燥し、個々のスポットをパンチを用いて、ディスクに切り出す。個々のディスクを、BLOTTTO (ジョンソン (Johnson) 等、ジェネティック・アナリティカル・テクニク (Gene, Anal. Tech.) 1巻、3頁 (1984年)) を含む、多穴トレイの個々のウェルに差し、約1時間、 37°C に維持した。

このBLOTTTOを、ウェルからアスピレータで除き、各ウェルに、 $200\mu\text{B}$ のハイブリドーマ培養上清を加えた。さらにこのウェルを2時間、 37°C に保ち、その後、このペーパーディスクを、TBSで2回洗浄し、ウェルから取り出し、TBSにより、さらに洗浄するため、1つの大きな容器に入れた。ついで、過剰の液体をその容器から除去する。

プロットプロット試薬キットの (M1州、アン・アーバー、プロメガバイオテック社) アルカリホスファターゼ結合抗マウスIgGを、BLOTTTOで5100倍に希釈し、このペーパーディスクと接触させた。このプロットプロット溶液との接触を、 37°C で30分間保った。その後、ペーパーディスクを、TBS中で3回洗浄した。筆者の指示に従い、プロットプロットキットに含まれている発色物質により、ディスク上に結合したアルカリホスファターゼが検出される。

c. ウェスタン・プロット検定法

ウェスタン・プロット検定のため、例4で報告したように単離した約 $10\mu\text{B}$ の $\text{h}\mu\text{TF}$ をサンプルバッファ (2% SDS、

50 mM ジチオスレイトール、10% グリセリン) に溶かし、5 分間、煮沸した。それから、これを、レムリ (Lemanli) により報告された (ネイチャー (Nature)、226 巻、680 頁 (1970 年))、参考としてここに述べられている、予め染色された分子重量標準の小さい両側のレーンの間の広いレーンに試料をロードする、分取型のスラブゲルを用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた (分子重量標準: MAM 州、ニュートンセンター、ディバシファアィド・バイオテック社)。参考としてここに述べられている、トウビン (Towbin) 等 (プロシーディング・イン・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、76 巻、4350 頁 (1979)) により報告されているように、電気泳動及びニトロセルロースへの電気ブロッティング後、このプロットを、TBS 中の 5% 脱脂粉乳溶液でブロックし、マニホルドに固定した (MAM 州、ケンブリッジ、イムネテックス社、ミニブロック)。8 個のハイブリドーマ細胞培養上清のストックを、各マニホルドスロットにロードし、37℃ で 1 時間インキュベートした後、このプロットを取り除き、TBS で洗浄した (0.02% アジ化ナトリウム含有 TBS)。抗体が結合したレーンを、発色物質で発色させたアルカリホスファターゼを結合した第 2 抗体を用い、供給業者の推薦する方法に従って可視化した (W1 州、マジソン、プロメガバイオテック、プロトプロット)。陽性のストック由来の培養上清を、5% 脱脂粉乳 TBS による 8 倍希釈物について、別個に再テストし、抗 TGF 抗体を生産する個々のハイブリドーマクローンの同定を行った。

抗 h u T F 抗体産生が正と判断されたハイブリドーマをさらに特徴づけるために選択した。例えば、上記の T F 8 融合体由来のハイブリドーマは、例 6 b で述べられているドット・プロット検

5 G 9 モノクローナル抗体 10 mg の透析により、活性化した。活性化した T F 8-5 G 9 を、2 mM のアフィゲル-10 アガロースビーズ (バイオラド) と混合し、できたカップリング反応混合物を、製造業者の指示に従って処理して、T F 8-5 G 9 / アガロース固体サポートを作った。

それから、例 3 で報告したように、固体サポート上の過剰のタンパク質結合部位をブロックし、洗浄後、滅菌通過して、T F 8-5 G 9 / アガローススケキを作った。

9. h u T F の免疫親和性による単離

ヒトの血のおよそ半分、すなわち約 100 mL に等しい、例 1 で調製した抽出液を、計 6 L のバッファ A に対し、2 回の外液交換をしつつ、4℃ で 3 日間透析した。その透析した抽出物を 1.5 時間、10,000 × g で遠心した。できた上清を、例 4 で調製したグリシンエチルエステル-アガローススケキと混合し、固液相反応混合物を作る。回転しながら、2 時間室温に維持したのち、その固相と液相を焼結ガラスロートによる遠過で分離した。その h u T F 含有液相を回収し、例 8 で調製した T F 8-5 G 9 / アガローススケキと混合し、固/液相反応混合物を作った。この免疫反応混合物を、回転しながら一晩、4℃ に保ち、組織因子含有固相免疫反応産物を形成させた。それから、この固相及び液相を先に述べたように遠過で分離した。固相が残留し、これを 10 倍容のバッファ A で洗浄した。その後、固相をガラスクロマトグラフィーカラムに移し、順次、0.1% トリトン X-100 を含む 2 倍容の 1 M NaCl、及び 0.1% トリトン X-100 を含む 2 倍容の 0.1 M グリシン (pH 4.0) で洗った。

上述の洗浄後、その固体サポートに免疫学的に結合している h u T F、その固体サポートを、焼結ガラスロート上に保持した

定法及び例 6 c で述べられているウェスタンブロット検定法で h u T F との免疫反応を、そのハイブリドーマ培養上清が示すならば、抗 h u T F 抗体産生ハイブリドーマ培養と特徴づけられる。これらの特徴は、24 個の T F 9 ハイブリドーマ細胞系列についてみられ、そのほとんどは、例 13 の第 5 表に示した。その他のスクリーニング法で選択したハイブリドーマにより産生される抗体分子は B 細胞を独自の融合体に提供する免疫化マウス (すなわち T F 8 又は T F 9)、及び、独特の H A T 増殖耐性ハイブリドーマ細胞が単離される、96 穴培養プレート、列番号及びウェル番号を示す文字によって呼ばれる (すなわち、5 B 7、11 D 12、その他)。特殊な意味の文字は、1 語、ハイフン語又は 2 語として、ここにリストされる。例えば次の文字は同じモノクローナル抗体分子組成を意味している: T F 8-5 G 9、T F 8-5 G 9 及び T F 8-5 G 9。

7. イムノグロブリン IgG の単離

イムノグロブリン IgG は、製造業者の指示に従って、バイオラドラボラトリーズ M A P S システムを用い、マウスのハイブリドーマ細胞系列 T F 8-5 G 9 (ATCC 系 H B 9382 号) を含むマウスの腹水液から単離される。単離した IgG のタンパク質濃度は、製造業者の説明書に従って、B C A タンパク質検定試薬 (ピアスケミカル社) を用いて測定した。

8. h u T F の免疫親和性による単離のための、抗 h u T F 含有固体サポートの調製

抗 h u T F 抗体を、アガロース固体マトリックスへカップリングするため、少なくとも 1 回透析液交換を行う、0.1 M MES、pH 6.5 を含む 500 mM の透析バッファに封する、4℃、16 時間の、例 7 で報告したように調製した、M A P S 系 T F 8-

5 G 9、0.1 M グリシン、pH 2.5 及び 1% トリトン X-100 溶液 20 mL で洗浄することにより、開放 (溶出) した。それから、例 4 にきて述べたように、溶出物質を回収し、h u T F 検定を行ない、集めて透析した。

透析物を 4 倍容の冷アセトンと混合し、h u T F タンパク質を沈殿化した。さらにこの沈殿をおよそ -10℃、5,000 × g、30 分の遠心で集めた。生成したペレットを真空雰囲気下で乾燥し、そのペレットの一部を変性条件での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した (SDS-PAGE)。

第 8 図に示したこの分析結果は、h u T F が免疫親和性により、脱脂粉乳 1 グラム当たり、33 mg の h u T F の収率で単離されることを示している。

10. 抗 h u T F 抗体による凝集の阻害

10 μL のハイブリドーマ培養上清を、例 4 で調製した約 2 mg の再脂質化 h u T F を含む 90 μL の H B S / B S A と混合した。このようにして作った免疫反応混合物を 30 分間 37℃ に保ち、抗 h u T F 抗体分子を免疫学的に h u T F に結合させ、免疫反応産物を形成させた。づいて、この免疫反応混合物について、例 2 で述べたように、h u T F のプロコアグラント活性を検定した。ネガティブ・コントロールとして、無関係の IgG 調製物を抗 h u T F 抗体の代りに用いた。

効果的 h u T F 濃度は、インヒビターの存在下測定した凝集時間を用い、例 2 のように作った標準曲線から外挿した。固着は、用いた実際の h u T F 濃度について、効果的 h u T F 濃度の比率として表わされる。少なくとも 50 パーセントの阻害をするモノクローナル抗体分子調製物は、本発明の抗体分子成分を中和するものとして選択された。

例6に述べたように、単離したh u T Fに対して生じたハイブリッド由来の数の多い培養上清を、凝集開始を阻害する能力について、先の操作により測定した。有意に凝集を阻害することが分ったハイブリッドマを、第5表に示した。

また、抗h u T F抗体による凝集阻害は、予め形成されたh u T F-因子Ⅷ複合体を用いて行った。例4で調製した再脂質化したh u T F 1ngを含む10μlを、HBS/BSA 70μl、20mM塩化カルシウム10μl及び、例3で述べられているように調製した因子Ⅷ25ngを含む10μlと混合する。この混合物を15分間37℃に保ち、h u T Fを、混合物として換える因子Ⅷと複合体をつくらせる。その後、10μlの溶液に、例7で述べたように調製したMAAPS-単離化モノクローナル抗体10ngを混合し、この第2の混合物を、30分間37℃に保った。さらに、第1に20mM塩化カルシウム100μlについて、ヒトのクエン酸化血漿又は例12で述べてように調製した因子Ⅷ欠損血漿を加え、ついで秒で表わされた凝集時間を観測することにより、生成した混合物の凝集阻害の測定を行った。例10で述べられているように、阻害率を表わし、予め形成したh u T F-因子Ⅷ複合体での阻害の結果を、第5表に示した。

第5表

抗h u T Fによるh u T F-因子Ⅷ依存の凝集阻害

1. クエン酸化ヒト血漿による凝集

| 抗体 | 因子Ⅷ | 阻害率 |
|----------|-----|-----|
| ブランク | + | 0 |
| TF 85 G9 | + | 58% |
| コントロール | + | 0 |
| TF 85 G9 | - | 83% |

複合体により開始する凝集を阻害する能力を有意にもつと考えた。これらのM o A bには、TF 9-1 B 8、TF 9-5 B 7、TF 8-5 C 4、TF 8-11 D 12、及びTF 8-21 F 2がある。

1.1. ポリペプチド合成

ここで使用されている種々のh u T F h領域に対応するポリペプチドをハゲンメイヤー (Hagenmeyer) 等 (ポッパーセラーズ (Hoppe-Seyler's) Z. F. i. j. o. l. o. g. i. c. a. l. -k. e. m. i. s. t. r. i. e., 353巻, 1973頁 (1982年)) のシンメトリカル・アンハイドライド法を用いたアブライド・バイオシステムズモデル430Aペプチド合成器で化学合成した。第1及び第2表のポリペプチドに加え、以下に示す第3表のポリペプチドも合成し、これには、h u T F hと反応できる抗ポリペプチド抗体の生産に有用な、本発明のポリペプチドが含まれている。

第3表

抗原性ポリペプチド

| | |
|----------|---|
| p121-155 | H-TKVHVTVVIDERTLVARNNTFLSLRDVFGKDLIYTL-OH |
| p204-226 | H-DSPVECHCQKGFREIFXIIGA-OH |
| p225-244 | H-GAVVVFVVIILVILAIISLHK-OH |
| p245-263 | H-CRKAGVGQSKXZHSFLNVS-OH |

1.2. ポリペプチドによる凝集阻害

h u T F依存の凝集開始を阻害する、本発明のポリペプチドの能力を、まず、このポリペプチドを因子Ⅷ/Ⅷa及びカルシウムイオン存在下でインキュベーションし、さらにこの混合物を、因子Ⅷ/Ⅷa欠損血漿に加えて、凝集時間を見積った。

ヒトの因子Ⅷ/Ⅷaを例3に述べた方法で単離した。HBS/BSAを8割り、この単離した因子Ⅷ/Ⅷa 200ngの溶液10μlに、100μl HBS、20μl 25mM CaCl₂、及び100

コントロール

B. 因子Ⅷテブリート化ヒト血漿

| 抗体 | 因子Ⅷ | 阻害率 |
|----------|-----|-----|
| ブランク | + | 0 |
| TF 85 G9 | + | 58% |
| コントロール | + | 0 |

a. "ブランク"とは、モノクローナル抗体を検定法で用いなかったことを示している。

b. "TF 85 G9"とは、ハイブリッドマTF 8-569から単離したモノクローナル抗体を検定法で用いたことを示している。

c. "コントロール"とは、検定で無関係なモノクローナル抗体を用いたことを示している。

d. "+"は、抗体を混合物に加える前、因子Ⅷを加え、調製したh u T Fと複合体を形成させることを示す。

抗h u T F抗体による凝集阻害の別の研究が、TFを因子Ⅷ/Ⅷaと混合させ、TF:因子Ⅷ/Ⅷa複合体を形成させる前後の阻害を比較する条件下で行った。

これらの研究で、予め形成したTF:Ⅷ/Ⅷa複合体を用いた抗h u T F h抗体による凝集阻害を、利用するモノクローナル抗体含有溶液10μlにMAAPS単離化モノクローナル抗体含有溶液の代りに、ハイブリッドマ培養上清を用いた以外、例10で述べたのと基本的に同様に行った。比較のため、抗h u T F抗体による凝集阻害を、例10で述べたように、因子Ⅷ/Ⅷaを含むクエン酸化血漿との混合の前、それら抗体及び再脂質化h u T Fの免疫複合体を形成することにより検定した。

ここで述べている全ての抗体は、この比較阻害検定試験を行ったが、約60%以上の阻害を示すものだけが、h u T F:Ⅷ/Ⅷa

μlの合成ポリペプチド含有TBS/トリトンを加えた。種々の濃度で含まれる多種の混合物をこのように調製し、それを、15分間、37℃に維持した。例4で述べたように調製した再脂質化した組織因子を、HBS/BSAで希釈し、例2で述べたような凝集検定法でテストしたとき、10μlでおよそ45秒の凝集時間が得られるように調製した。上記のように維持した混合物をさらに、再脂質化h u T F 10μl希釈物、25mM CaCl₂、100μl及び1容の血漿に対し1.5容のHBSで希釈した因子Ⅷ/Ⅷa欠損血漿10.0μl (KA州、オーバーランド・パーク、ジョージ・キング・バイオメディカル社)と混合した。凝集時間の延長は、この合成ポリペプチドによる凝集の阻害を示していることになる。阻害率を、例10で述べているように計算した。少なくとも30%の凝集阻害を示すポリペプチドはh u T F h結合部位ポリペプチド類似物、すなわち、第4表のセクションIで示されているポリペプチド、p26-49、p146-107及びp161-189である。

別に、上記阻害検定において、モノクローナル抗体による免疫阻害阻害により、因子Ⅷ/Ⅷa欠損血漿である因子Ⅷ/Ⅷa欠損血漿を用いた。ヒトの因子Ⅷ/Ⅷaに対するモノクローナル抗体を、例3で述べたように単離した因子Ⅷ/Ⅷaをh u T Fの代りに免疫原として用いた以外、例5で述べたものと基本的に同様に調製した。できたハイブリッドマを、イライザ法で評価し、IN州、サウスベンド、エンザイム・リサーチ・ラボラトリーズ社から入手できるヒトの血液タンパク質、タンパク質S、因子IX、因子X及び因子IIと反応しないハイブリッドマを同定した。そのようなハイブリッドマ、FV11、F1、2H3-3.2は、I.S. エジントン (Edgington) 博士から取いた (CA州、ラジラ

スクリアス・クリニック・アンド・リサーチ・ファンデーション社)。イムノグロブリン IgG を、ハイブリドーマ FV11、F11、2H3-3.2 を含むマウスの腹水から単離し、この単離した IgG を、例 8 に述べたように、固体サポートに結合させた。適合した抗因子 W/Va モノクローナル抗体含有固体サポートを貯留した正常なクエシ酸化血漿から、血漿含有凝相を収獲し、保留すること以外、例 9 で述べた免疫親和性操作を用いて、因子 W/Va を除くのに用いた。

脂質化型で用いたとき、融合的に凝集を阻害する、いくつかのポリペプチドの能力を、100 μ M の合成ポリペプチド溶液の代わりに、100 μ M の脂質化合成ポリペプチドを用いることにより上記検定法での評価を行った。

脂質化合成ポリペプチドは、合成ポリペプチドを、単離した h u T F の代わりに用いること以外、単離した h u T F の再脂質化で用いた、例 4 で述べた方法で調製した。ルーチンには脂質とポリペプチドの比は 52:1 (w/w) が用いられた。少なくとも 30% の凝集阻害を起こす脂質化ポリペプチドが、脂質化型で存在するとき、h u T F 結合部位ポリペプチド類似物すなわち、第 4 表のセクション II で示されたポリペプチドと考えた。

第 4 表

h u T F h のポリペプチド類似物の
h u T F による凝集開始の阻害

| ポリペプチド | 濃度 | 阻 害 |
|-----------------|------|------------|
| I. 非リン脂質化ポリペプチド | | |
| p1-30 | 25.0 | 10 μ M |
| p26-49 | 88.8 | 10 μ M |
| p41-71 | 25.0 | 10 μ M |

た。

5.0 μ M のハイブリドーマ培養上清を各ウェルに入れ、1時間 37°C に維持した。さらにこのウェルを TBS で 3 回洗浄し、過剰の液体をアスピレートで除いた。

単離化 h u T F は、例 9 で述べたように、免疫親和性カラムで調製した。単離化 h u T F を含むアセトン沈殿を TBS/トリトンに溶かし、そのタンパク質濃度を、製造業者の説明書に従い、BCA タンパク質検定試薬 (ピアス) を用いて測定した。h u T F の炭化水素側鎖を、オシャネシー (O'Shaunessy) 等の報告した方法 (イムノロジカル・レターズ (Immunol. Letters), 8 巻、273-227 頁 (1984 年)) に従い、ビオチン-ヒドラジド (NY 州、ブレインビュー、ICN バイオメディカル社) を用いて、ビオチン化し、ビオチン化 h u T F 溶液を作った。

TBS/トリトン中 60 μ g/mL に調製した 50 μ M のビオチン化 h u T F 溶液を、5 μ M 合成ポリペプチドとともに、各ウェルに入れ、1時間、37°C に維持した。その後、このウェルを TBS/トリトンで 3 回洗浄した。

5 mM EDTA、0.5% トリトン X-100 及び 1% BSA を含む TBS で 1/100 に希釈した、100 μ M のストレプトアビジン-結合アルカリホスファターゼ (NY 州、ニューヨーク、エンジバイオケム社、デテクトール) を各ウェルに入れ、30 分間、37°C に維持した。その後、このウェルを、10 mM リン酸カリウム (pH 6.5)、2% BSA、0.5% トリトン X-100、0.5 M 塩化ナトリウム及び 1 mM EDTA を含む溶液を 4 回洗い、ついで検出バッファ (0.1 M トリス・塩酸 (pH 8.8)、0.1 M NaCl、5 mM MgCl₂) で 1 度洗った。

その後、検出バッファ中、2 mM の p-ニトロフェニルリン酸

| | | |
|----------|------|------------|
| p40-49 | 25.0 | 10 μ M |
| p56-71 | 25.0 | 10 μ M |
| p72-104 | 25.0 | 10 μ M |
| p94-123 | 20.0 | 10 μ M |
| p121-155 | 10.0 | 10 μ M |
| p146-167 | 87.5 | 10 μ M |
| p161-189 | 32.5 | 10 μ M |
| p190-209 | 20.0 | 10 μ M |
| p204-226 | 20.0 | 10 μ M |
| なし | 0 | |

B. リン脂質化ポリペプチド

| | | |
|----------|------|------------|
| p1-30 | 81.0 | 10 μ M |
| p26-40 | 83.0 | 10 μ M |
| p40-71 | 65.0 | 10 μ M |
| p50-71 | 73.3 | 30 μ M |
| p94-123 | 93.7 | 10 μ M |
| p121-155 | 55.0 | 10 μ M |
| p146-167 | 80.0 | 10 μ M |
| p161-189 | 94.0 | 10 μ M |

a. 例 12 で述べたように測定した阻害率

上記のポリペプチド阻害研究で得られた代表的阻害率と一応答曲線を第 9 及び第 10 図に示した。

13. ポリペプチドによる抗体-h u T F 免疫反応の阻害

フレキシブルビニルでできたイムロニU底 96 穴プレート (ダイナテック社) のウェルを過剰タンパク質結合部位のブロッキングを、37°C 20 分間行うこと以外、例 6 で述べた方法でヤギ抗マウス IgG (ペーリンガー・マンハイム社) によりコーティングし

を含む溶液 100 μ L を各ウェルに加え、1時間 37°C に維持する。ついで、405 ナノメーターでの光学密度を各ウェルについて、バイオ・テック・マイクロプレートリーダー (VT 州、ウィノースキ、バイオ・テック・インスツルメント) を用いて測定した。

この競合的阻害研究の結果を第 5 表に示した。

第 5 表

モノクローナル抗体とポリペプチドの相互作用の表

| Mad* | p1 | p26 | p40 | p41 | p56 | p72 | p94 | p121 | p146 | p161 | p190 |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
| | -30 | -49 | -71 | -49 | -71 | -104 | -123 | -155 | -167 | -189 | -209 |

| | | | | | | | | | | | |
|----------|---|---|---|--|--|---|--|--|--|---|---|
| TF85G9 | + | | | | | | | | | | |
| TF811D12 | + | | | | | | | | | | |
| TF85C4 | | | | | | | | | | | |
| TF821P2 | | + | | | | | | | | | |
| TF91D5 | | + | + | | | | | | | | |
| TF92C4 | | + | + | | | | | | | | |
| TF92P6 | | | | | | | | | | | |
| TF95C7 | | + | + | | | | | | | | |
| TF96B4 | | + | | | | | | | | | |
| TF99C3 | | + | + | | | | | | | | |
| TF910C2 | | | | | | | | | | | |
| TF91F1 | | + | | | | | | | | | |
| TF91E7 | | | | | | + | | | | | |
| TF91B8 | | | | | | | | | | + | + |
| TF91B9 | | | | | | | | | | | |
| TF94D11 | | + | + | | | | | | | | |
| TF95C4 | | | | | | | | | | | |
| TF95B7 | | + | + | | | | | | | | |
| TF95C4 | | | | | | | | | | | |

| | | |
|----------|---|---|
| TF97E10 | + | + |
| TF98E8 | + | + |
| TF99E1 | + | + |
| TF99B4 | + | + |
| TF96C8 | + | + |
| TF910H5 | + | + |
| TF99D5 | + | + |
| TF910H10 | + | + |

- a. 各モノクローナル抗体 (Hb) は、同名のハイブリドーマにより産生された。全てのハイブリドーマは例13で述べたように、ハイブリドーマ培養物上清を用いてスクリーニングした。
- b. これらの抗体は、例10の結果から中和性をもたないと考えた。その他の全ての抗体は、同結果に従い中和性をもつと考えた。

もし、ポリペプチド存在下で得られた吸光度測定値が、ポリペプチド存在下で与えられた抗体に対して得られた平均値から1以上の標準偏差をもつとき、阻害が有意に起こったと考えた。

14. 2部位イライザ法による身体サンプルにおける h u T F 検出

血液、血清、唾液、尿、その他の身体サンプル中の h u T F は、同じ h u T F 分子に同時に結合することができる2つのモノクローナル抗体を用いて検出できる。

イムロン・ポリスチレン底96穴プレートに、まず、各ウェルに、TBS中100 μg/mlに希釈した1 gC-100 μg/mlを入れ、ついで、ウェルと、1 gC溶液との接触を、4℃、一晩維持することにより、ヤギ抗マウス1 gC (ペーリンガー・マンハイム社) でコートした。そのウェルを、TBSで3回洗浄し、ついで、

が h u T F に同時に結合できる能力をもつ限り、いろいろ変えることができる。例えば、第1抗体として、TF9-6B4を用いたとき、TF9-11D12を、TF9-10H10の代りに、第2の抗体として用いることができる。このように、本発明は、本検定法で同時に結合できる種々の抗体の組合せを考案した。

15. 全プレ h u T F h コード配列を含む DNA 断片の構築

全プレ h u T F h コード配列を含む DNA 断片を第11図にその制限地図に示されている、組換えプラスミド p C T F 64、p C T F 403及び p C T F 314と、この分野でよく知られている操作を用いて構築することができる。例えば、マニアチス (Maniatis) 等、NY州、コールドスプリングハーバー、モレキュラー・ラボラトリー、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニング (1983年) 参照。

第11図で示されている組換え DNA プラスミド中に含まれる挿入断片は、クローニングを可能にする、各末端の EcoR I リンカー 5'-CGAATTC-3' (M A 州、レキシントン、コラボラチブライナー社) を有している。これらのリンカー配列は、天然の h u T F h DNA コード配列の一部ではないので、第2図に示されるスクレオチド配列中には存在しない。組換え DNA 分子構築の説明は、関係する h u T F h DNA 配列についても明らかに、EcoR I 末端を含む消化により生じ、これらの付加的なリンカー配列を含む断片は、第2図で示したスクレオチド塩基番号によって示されるだろう。この断片は、その末端にこれら付加的配列を含むことが理解できよう。

プラスミド p C T F 64 を、制限エンドヌクレアーゼ EcoR I 及び Dra III で消化し、第2図で示される、塩基番号1~296番に対応するスクレオチド配列を含む DNA 断片を作った。このよ

各ウェルに、3% BSA を含む TBS / トリトン 100 μg/ml を加えた。その後、これらのウェルを1時間、37℃に維持してから、TBSで3回洗浄し、さらに、過剰の液体をアスピレータで除いた。

第1のハイブリドーマ、TF9-6B4由来の抗 h u T F 抗体分子含有培養上清100 μg/ml を各ウェルに入れ、1時間37℃に維持した。それから、これらのウェルをTBSで3回洗浄し、ついで過剰の液体を、アスピレータで除いた。

例9で調製したように、免疫吸和性単離し、アセトン沈殿化 h u T F を、TBS / トリトンに溶した。この h u T F 溶液の希釈物をTBS / トリトンで5 μg/ml から0.5 μg/ml の範囲で調製し、希釈液100 μg/ml をイムロンプレートのウェルに入れた。この h u T F 希釈液を、第1の抗体と接触させ、1時間37℃に維持した。さらにこの希釈物をウェルから除き、ウェルをTBS / トリトンで3回洗浄した。過剰の液体をアスピレータで除いた。

抗 h u T F 抗体を、例7で述べた方法により、第2のハイブリドーマ TF9-10H10 の懸液から MAPS で単離した。この抗体接合のタンパク質を測定し、ついで、例13で述べたようにバイオチン化によりラベル化した。

このバイオチン化した抗 h u T F 抗体をTBS / トリトンで60 μg/ml に希釈し、この溶液100 μg/ml を各ウェルに入れた。そのウェルを1時間、37℃に維持し、ついでTBS / トリトンで3回洗った。

この結合した、バイオチン化抗 h u T F 抗体を、例13で述べたデテクトールシステムを用いて検出した。この検定法で第1及び第2の抗体として用いているモノクローナル抗体は、その2つ

うにして作った、302スクレオチド塩基対 (bp) 断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画により単離し、アルカリホスファターゼを用いた処理により脱リン酸化した。

プラスミド p C T F 403 を制限エンドヌクレアーゼ EcoR I で消化し、第2図の塩基776~1125番に対応するスクレオチド配列を含む DNA 断片を作った。生成した352 bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分画により単離した。

プラスミド p C T F 314 を、制限エンドヌクレアーゼ EcoR I で消化し、生成した647 bpの断片をサイズ分画で単離した。この断片は、第2図の塩基135~775番の配列に対応するスクレオチド配列を含んでいる。647 bp断片をサイズ分画で単離し、アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。

この352 bp断片及び脱リン酸化した647 bp断片をT4 DNA リガーゼの反応によって機能的に結合 (ライゲーション) し、第2図の塩基135~1125番に対応するスクレオチド配列を有する999 bpの断片を作った。

さらに、この999 bp断片を、制限エンドヌクレアーゼ Dra III で消化し、第2図の塩基296と297番の間でこの999 bp断片を切断し、これによって、168 bpと831 bpの断片が生ずる。さらに脱リン酸化した302 bpの断片と、831 bpの断片をT4 DNA リガーゼで機能的に結合し、第2図の1~1125番に対応するスクレオチド配列を含む1125 bp断片を作った。

EcoR I で消化して、クローニングプラスミドベクター p UC 8 を線状にした。先に調製した1133 bp断片と、EcoR I 消化したベクターをT4 DNA リガーゼで機能的に結合して環状組換え DNA 分子 p UC-プレ h u T F h を作った。

大腸菌 RR1 株 (MD 州、ゲイサズバーグ、ベセスダ・リサ

ーチラボラトリーズ)をpUC-*blehuTFh*でトランスフォームし、そしてアンピシリン耐性に基いて、トランスフォーマントを選択した。それから、この選択したトランスフォーマントをクローニングし、*blehuTFh*構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によりスクリーニングした。

*blehuTFh*構造遺伝子をもつ組換えDNA分子の存在によるスクリーニングは、各選択されたトランスフォーマント由来のrDNAをEcoRIで消化することによって行った。生じたEcoRI断片をアガロースゲルでサイズに従って分離した。352bp、781bp及び2682bpのDNA断片に対応する三つのバンドパターンを示す組換えDNA分子で*blehuTFh*構造遺伝子の存在を確認した。上述のEcoRI消化パターンを生ずるrDNAを有する大腸菌RR1トランスフォーマントは、本発明の組換えDNA分子を含み、かつ、選択され(回収)された。

細胞外アンカー領域を含むが、カルボキシル末端にトランスメンブレン・アンカー領域を欠く、*blehuTFh*コード配列の真実的領域を含み、従って、可溶性*huTFh*タンパク質をコードするDNA断片を次のように構築した。

プラスミドpCTF64を制限エンドスクレアーゼEcoRIで消化し、第2図の1~486番の残基に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。このようにしてきた486bpの断片を、アガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し、その後、アルカリホスファターゼ処理で脱リン酸化した。つぎに、このように脱リン酸化した486bpの断片を制限エンドスクレアーゼDraIIを用いて消化し、第2図の296番と297番の間の部位で、486bp断片を切断し、296bp及び190bpの断片とした。この296bpの断片をアガロースゲルのサイズ分画で単離した。

(1983年))の方法に従い、互いにオリゴヌクレオチドが線形的に結合するのを防ぐため、ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化を行なわれなかったこと以外は同様にして、

5'-*ATTTTACAGATAAGAAATTCGGG*-3'及び

3'-*ATCTCTTATCTTAAAGCCG*-5

の配列をもつ、合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作った。このオリゴヌクレオチドをアニールし、粘着EcoRI末端を含む二本鎖DNAリナー断片を作り、ローザースタイン(Rothstein)の方法(メソーズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.)), 68巻、98頁(1979年))に従って、平滑末端とした。つぎに、このリナー断片を、pUC-*blehuTFh*-Tから得た775bp断片に線形的に結合し、775bp断片の各末端に1つのアニール断片を含む817bp断片を作った。その後、この817bp断片をEcoRIで消化し、817bp断片の各末端を平滑からEcoRI粘着末端へと転換し、805bp断片とした。この805bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単離した。

クローニングプラスミドベクターpUC18をEcoRIで消化し線状化した。先に調整した805bp断片とEcoRI消化したベクターをT4DNAリガーゼを用いて線形的に結合し、環状組換えDNA分子pUC-*blehuTFh*-TRとした。

大腸菌RR1をpUC-*blehuTFh*-TRでトランスフォームし、pUC-*blehuTFh*-TRを含むクローンである、アンピシリン耐性トランスフォーマントを選択した。

16. 組換え*huTFh*コード配列の発現に反*huTFh*の生産組換えDNA分子由来の組換え*huTFh*の発現は原核性細菌細胞、非寄生真核性細胞及びより高等な(脊椎)真核性細胞を含

プラスミドpCTF314を制限エンドスクレアーゼEcoRIで消化し、第2図の135~775番の残基に対応するスクレオチド配列を含むDNA断片を作った。この641bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画で単離し、ついで、アルカリホスファターゼ処理により脱リン酸化した。この脱リン酸化した641bp断片を、DraIIで消化し、第2図の296番及び297番の間の部位で、この641bp断片を切断し、これにより、162bp及び479bpの断片とした。このうち、479bp断片をアガロースゲルを用いたサイズ分画により単離した。

上述のように調整した296bp及び479bpの断片を、T4DNAリガーゼを用いた反応により線形的に結合(ライゲーション)し、第2図の1番から775番の配列に対応するスクレオチドアダプター配列を有する775bp断片を作った。

クローニングプラスミドベクターpUC18をEcoRIによる消化で線状化する。上記のように調整した775bp断片と、EcoRI消化ベクターをT4DNAリガーゼで線形的に結合し、環状組換えDNA分子pUC-*blehuTFh*-Tを作った。

大腸菌RR1を、pUC-*blehuTFh*-Tでトランスフォームし、pUC-*blehuTFh*-Tを含むクローンであるアンピシリン耐性トランスフォーマントを選択した。

組換えDNA分子pUC-*blehuTFh*-TをEcoRIで消化し、生成した775bp断片をサイズ分画で単離した。

カルーザス(Caruthers)等(ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ(J. Am. Chem. Soc.)), 103巻、3185頁(1981年))及びゲイト(Gait)等(コールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム・クオント・バイオロジー(Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.))47巻、393

巻の発現媒体中で行うことができる。そのような発現媒体の代表例には、各々、大腸菌S、セラピシアエ(*ceratiasae*)及びチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞がある。

a. 大腸菌における*blehuTFh*の発現

大腸菌において、*blehuTFh*構造遺伝子を発現できる組換えDNA分子は、例15で作ったpUC-*blehuTFh*組換えDNA分子由来の*blehuTFh*遺伝子含有DNA断片を単離し、ついで、この断片を原核性発現ベクターに線形的に結合することにより構築することができる。

組換えDNA分子pUC-*blehuTFh*を、そのプラスミド中に存在するEcoRI部位を部分的に切断するような条件で、EcoRI消化する。この部分消化法は、アニアチス(Maniatis)等、NY州、コールドスプリング・ハーバー、コールドスプリングハーバー・ラボラトリーズ、ラボラトリーマニュアル、モレキュラー・クローニングにより詳細に報告されている。図2の残基1番から、1125番で示される配列に対応するスクレオチド配列を含む1133bp断片を、サイズ分画によりEcoRI部分分解産物から単離した。

原核性発現ベクターpKK223-3(NJ州、ピスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社)を、EcoRIによる消化で線状化した。この消化ベクター及び1133bp *blehuTFh*構造遺伝子含有断片をT4DNAリガーゼを用いて線形的に結合し、環状組換えDNA分子pKK-*blehuTFh*を作った。

大腸菌RR1をpKK-*blehuTFh*でトランスフォームし、pKK-*blehuTFh*含有クローンとしてアンピシリン耐性トランスフォーマントを選択した。

b. 大腸菌における h u T F h の発現

大腸菌において h u T F 遺伝子を発現することができる組換え DNA 分子は、例 16 a で調製した 1133 bp 断片を操作して構築した。まずこの断片をアルカリホスファターゼで脱リン酸化し、ついで、制限エンドヌクレアーゼ Bbv I で消化した。生じた 964 bp の断片は、第 2 図の残基 164 ~ 1125 番に対応するスクレオチド配列を含んでおり、サイズ分画により単離した。

先に述べたように、

5'-AATTGACATGTCAGGCACTACAAATACGTGGCAGCATATAATT-3',

及び

3'-CTGTACAGTCCGTCATGTTATGACACCGTCGTATATTAAATTC-5',

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作り、ロザースタイン (Rothenstein) 等 (メソックス・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.) 68 巻, 98 頁 (1979 年)) の方法に従って、粘着 EcoR I 及び Bbv I 末端を含む二本鎖 DNA リンカー断片をアニールリングすることにより作った。このリンカーをまず 964 bp 断片に機能的に結合して、1008 bp 断とし、ついで、1008 bp 断片を、T4 DNA リガーゼを用い、EcoR I 消化したベクター pKK223-3 と機能的に結合し、環状組換え DNA 分子 pKK-h u T F h を作った。

組換え DNA 分子 pKK-h u T F h は、pKK-ブレイク h u T F h と、田残基 1 ~ 125 番の残基がない、及び切断しにくいメチオニンコドンが、残基 130 番の前に機能的に結合しており、その結果タンパク質発現 (翻訳) が挿入されたメチオニンコドンの場所ではじまることだけが異なる。

組換え DNA 分子 pKK-ブレイク h u T F h 及び pXII-h u T F h を、その中に含まれる構造遺伝子によりコードされる h u T F h

を、それからこの選択したトランスフォーマントをクローン化した、モノクローナル抗体 T F 8-5 G 9 を用いて、発現するブレイク h u T F h タンパク質の存在を各クローンについて決定して、pSV-ブレイク h u T F h の存在に関する選択を行った。

d. CHO 細胞における h u T F h の発現

ホ乳類細胞において、h u T F h を発現することができる組換え DNA 分子を、例 16 c 由来の pSV-ブレイク h u T F h を、制限エンドヌクレアーゼ Bgl II で消化することにより構築した。生じた 1153 bp 断片をサイズ分画で単離し、ついで、制限エンドヌクレアーゼ Bbv I で消化した。生じた 974 bp 断片は、図 2 の残基 164 ~ 1125 番の配列に対応するスクレオチドアダプター配列を含み、これを、サイズ分画により単離した。

先に述べた方法で、

5'-GATCGACATGTCAGGCACTACAAATACGTGGCAGCATATAATT-3',

及び

3'-CTGTACAGTCCGTCATGTTATGACACCGTCGTATATTAAATTC-5',

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を合成し、アニールして、粘着性 Bgl II 及び Bbv I 末端を含む二本鎖 DNA リンカー断片を作った。ついで、このリンカーを T4 DNA リガーゼを用いて 974 bp 断片に機能的に結合して、第 2 図の残基 130 ~ 1125 番の残基の配列に対応するスクレオチド配列を含む、1018 bp 断片を作った。

プラスミド発現ベクター pKSV-10 を、Bgl II で消化して線状とし、ついで、T4 DNA リガーゼを用いて、1018 bp 断片に機能的に結合し、環状組換え DNA 分子 pSV-h u T F h を作った。

組換え DNA 分子 pSV-ブレイク h u T F h 及び pSV-h u T F h

又はブレイク h u T F h の発現に適合する原核性宿主細胞に導入した。

そのような宿主細胞の代表例は、大腸菌 RR1 株である。この宿主を、組換え DNA 分子でトランスフォームし、細胞増殖とこの組換え DNA の発現に適合する条件下で培養し、この発現したタンパク質を従来の技術を用いて収獲した。

c. CHO 細胞におけるブレイク h u T F h の発現

脊椎動物細胞中、ブレイク h u T F h 遺伝子を発現できる組換え DNA 分子を例 16 a で調製した 1133 bp 断片を用いて構築した。

カルーザス (Carothers) 等及びゲイト (Gait) 等の方法 (上記) を用い、

5'-AATTTCCTCCGGG-3', R₁

5'-GATCCCTCCGGG-3',

の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドアダプター断片を作った。ついでこのオリゴヌクレオチドアダプター断片を、ロザースタイン (Rothenstein) 等の方法 (メソックス・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.) 68 巻, 98 頁 (1979 年)) を用い、1133 bp 断片の各末端に結合し、元々 1133 bp 断片に存在する EcoR I 粘着末端を、Bgl II 粘着末端に転換した。

真核性シミアンウイルス (SV40) を基本とする発現ベクター、pKSV-10 (N.J. ビスカタウェイ、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ社) を、制限エンドヌクレアーゼ Bgl II による消化で線状化した。1133 bp の Bgl II 適合断片及び、Bgl II 消化ベクターを、T4 DNA リガーゼを用いて、機能的に結合し、環状組換え DNA 分子 pSV-ブレイク h u T F h を作った。

大腸菌 RR1 を、pSV-ブレイク h u T F h でトランスフォームし、アムピシリン耐性のトランスフォーマントを選択し、クローン化し

を、内在する構造遺伝子によりコードされる h u T F h 又はブレイク h u T F h タンパク質の発現するのに適合した真核性宿主細胞中に導入した。このような細胞を含む宿主細胞の代表例には、CHO 細胞がある。

宿主を、組換え DNA 分子でトランスフェクトし、安定なトランスフォーマントを従来法で選択した。例えば、グラハム (Graham) 等、ビロゾー (Vivol.)、52 巻、456 頁 (1973 年) 及びサウザーン (Southern) 等、ジャーナル・オブ・モレキュラー・アンダー・アブライド・ジェネティクス (J. Mol. Appl. Genet.) 1 巻、327 ~ 341 頁 (1982 年) 参照。トランスフォームした宿主細胞を、細胞増殖及びその組換え DNA 発現に適合した条件下で培養し、発現したタンパク質を、従来法により収獲した。

e. イーストにおけるブレイク h u T F h の発現

S. セレビシアエ (cerevisiae) において、ブレイク h u T F h 遺伝子を発現できる組換え DNA 分子を、先に述べたように、

5'-AATTTCCTCCGGG-3', R₁

5'-CGCCCTCCGGG-3',

の配列をもつオリゴヌクレオチド、アダプター断片を合成し、ついで例 16 a の 1133 bp 断片の末端に、それを結合することにより構築した。このようにして作ったアダプター化した断片は、Cla I 粘着末端をもつ。

イーストの発現ベクター、pTD1 (アメリカン・タイプ・ティッシュコレクション、#ATCC31255) を、制限エンドヌクレアーゼ Cla I での消化により線状化した。上記の Cla I アダプター化 1133 bp 断片及び Cla I 消化ベクターを、T4 DNA リガーゼを用いて、機能的に結合し、環状の組換え DNA

分子 pY-プレhуTFhを作った。

大腸菌RR1をプレhуTFhでトランスフォームし、プレhуTFh構造遺伝子を発現するトランスフォーマントを、例16cで述べた方法により同定及び選択を行った。

f. イーストにおけるhуTFhの発現

S. セレビシアエ (cerevisiae) において、hуTFh構造遺伝子を発現できる組換えDNA分子を、pY-プレhуTFhのC1a1による消化により、第2図の残基1~1125番の配列に対応するスクレオチド配列を含む1151bp断片を作ることによって得た。サイズ分画による単離後、1151bp断片をBbv1で消化し、第2図の残基184~1125番の配列に対応するスクレオチド配列を含む978bp断片を作った。この978bp断片は、サイズ分画により単離した。

5'-CGGACATGTCAGGCACTACAAATATCTGGCCAGCATATTAATT-3'、

及び

3'-CTGTACAGTCGGTGTATGATGACACCGTGTATATTAAATTC-5'、

の配列をもつ合成ポリヌクレオチドアダプター断片を作り、先に述べたように、アニールすることで、C1a1及びBbv1粘着末端をもつDNAアダプターを作った。まず、このアダプター断片を、978bp断片に特異的に結合することにより、1020bp断片とした。つづいて、この1020bp断片を、T4DNAリガーゼを用い、例16aで述べられているように調製したC1a1消化pTDT1ベクターと結合し、環状組換えDNA分子pY-hуTFhを作った。

組換えDNA分子pY-プレhуTFh及びpY-hуTFhを、内在する構造遺伝子によりコードされるhуTFh又はプレhуTFhタンパク質の発現に適合するイースト宿主媒体中に導

入した。このような媒体を含む宿主細胞の代表例には、S. セレビシアエ (cerevisiae) 細胞がある。

宿主細胞を、この組換えDNA分子でトランスフォームし、選択培地で培養して、従来法により、トランスフォームした細胞を単離した。例えば、ハイネン (Hinnen) 等プロシーディング・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、75巻、1929頁 (1978年) 及び、ミヤジマ (Miyajima) 等、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.) 4巻、407頁 (1984年) 参照。トランスフォームした細胞を、細胞増殖及び組換えDNA発現に適合する条件下で培養し、ついでこの発現したタンパク質を従来法で収獲した。

g. 組換えhуTFhコード配列の発現による可溶性hуTFhの生産

組換えDNA分子からの可溶性hуTFhの発現は、プレhуTFh及びhуTFhに対し、例16で述べたのと同様に、種々の発現媒体で行なわれた。その例において、EcoRI粘着末端を有する断片を含む1133bpのプレhуTFh構造遺伝子の例16aでの作成と、つづいて、例16b-fでの操作で、大腸菌、S. セレビシアエ (cerevisiae) 及びCHO細胞の3種の発現媒体において、プレhуTFh又はhуTFhを発現できるベクターを作った。同様に、EcoRI粘着末端を有する可溶性プレhуTFh構造遺伝子を含み、例16aで調製した805bpの断片を例16b-fで述べた方法に従って操作し、これら同発現媒体中可溶性プレhуTFh又はhуTFhを発現できる発現ベクター (すなわち、プレhуTFh-TR又はhуTFh-TR) を作った。

17. ポリペプチド p24-35 及び p159-169 による凝集阻害

第7表にそのアミノ酸残基配列を示した例11で述べたように合成した。

第 7 表

| ペプチド名 | アミノ酸残基配列 |
|----------|------------------------|
| p24-35 | H-EWEPPKPVNVYT-OH |
| p159-169 | H-IYTLVYHNSSSSGKTXK-OH |

a. 各ポリペプチド実験名は、第1図に含まれているアミノ酸残基配列を表わしている。

それから、ポリペプチド p24-35 及び p159-169 について、例12で述べられているように、hуTFによる凝集開始を競合的に阻害する能力を決定した。この研究の結果を第12図に示し、p24-35 及び p159-169 は、10μM濃度で用いたとき、各々、hуTFで開始した凝集を、45%及び25%阻害できることを示している。この研究において、第12図で白丸により示したこれらペプチドに対する阻害バックグラウンドは、第4表で示した実験結果よりも低いことに注意しなければならない。結果として、この研究において、10μM濃度での凝集阻害を少なくとも20%起こすポリペプチドは、hуTF結合部位ポリペプチド類似物と考えた。

従って、ポリペプチド p24-35 及び p159-169 は本発明のhуTFhポリペプチド結合部位類似物を示している。また、ポリペプチド p25-49 で得られた同様の結果を考慮すると、p24-35 で得られた結果は、hуTFh-因子Ⅳ/Ⅴa結合部位は、これら2つのポリペプチドの共通部分、すなわち、

第1図で示した残基30~35、(-VNVQVYT-) のアミノ酸残基配列で作られていることを示していることに注目すべきである。

18. 抗hуTF抗体による凝集阻害の速度試験

抗hуTF抗体が、hуTFの凝集開始を阻害できる時間を測定するため、この阻害の時間経過を、例10で述べた阻害検定法を用いて測定した。

例7で述べたように調製した、MAPS単離化TF8-5C9モノクローナル抗体およそ1mgを、100μl HBS/TBS中、例4で述べたように調製した再脂質化hуTFおよそ1mgと混合した。このように形成した種々の混合物を、37℃で、約1から60分の間の種々の時間維持し、抗hуTF抗体を、hуTFと免疫学的に結合させ、免疫反応産物を作った。第13図で示した時間に、各混合物について、例2で述べたように、hуTFの凝集活性を決定し、ついで、例10で述べたように阻害率を示した。

第13図で、このような速度論的測定の結果は、この決定で用いた抗体及び精製したhуTFの濃度で、65%以上のhуTFによる凝集開始の阻害が、10分以内に起こることを示すことが分る。より高い抗hуTF抗体濃度では、より速く、完全な阻害が起こると考えられる。

19. 抗hуTF抗体による、hуTFによる凝集開始阻害の投与-応答

抗体投与範囲にわたる、hуTF凝集開始を阻害する本発明の抗hуTF抗体の能力は、次の修正をした例で述べた方法により決定した。例4で調製した再脂質化hуTF1mgを、0.1μlのHBS/BSSA中、例7で述べたように単離した、種々の量の

平成 7.12.20 発行

TF8-5G9モノクローナル抗体と混合した。このように調製した混合物を維持して免疫反応産物を作り、つづいて例10で述べたように、h u T F の凝集活性に関する検定を行った。

そのような投与一応答検定の結果を、第14図に示し、また、このことはこの研究で用いたh u T F 濃度に対し、 μg 当たり、およそ1~5 ng の抗h u T F の最高値の半分の阻害を示している。

同様の投与一応答実験を、h u T F 源として溶解したヒト細胞を用いて行った。

ヒトの組織培養細胞系GM1381 (N1GMSヒューマン・ジュネチック・ミュータント・セル・レポジトリ) を、2 mM グルタミン、5%ウシ胎児活性及び抗生物質を補った、ダルベコ修正イーグル増地 (DMEM, NY州、グラントアイランド、ギブコラボラトリー) 中、37℃で、7% (v/v) 二酸化炭素空気雰囲気下で培養した。GM1381細胞を増殖し、そして収穫し、さらに 3.0×10^6 個の細胞のペレットを遠心で調製し、-70℃で凍結した。この凍結ペレットをHNバッファ (25 mM ヘプス、140 mM NaCl、pH 7.0) 中の15 mM ベータ、オクテチルグルコシラノシド溶液9 μg を加えて急速に融解し、さらに10分間37℃に維持して、細胞を溶解した後、HN18 μg を加えて、細胞溶解物を作った。

例17で述べたように単離したモノクローナル抗体TF8-5G9を、第15図に示した種々の投与に対し、0.01%BSA (シグマ、RIA級) で希釈した。それから各抗体希釈物25 μg に、先に調製した細胞溶解物225 μg を加え、60分間37℃に保って、抗体を細胞溶解物中に存在するh u T F と免疫反応させ、免疫反応産物を形成させた。その後、25 mM CaCl₂、

50 μg を、免疫反応産物を含む溶液50 μg と混合し、ついで、50 μg のクエン酸化ヒト血漿と混合し、凝集を開始させた。このようにして作った混合物を37℃に維持し、血漿の添加と、凝血形成の間の時間を測定した。効果的h u T F 濃度及び阻害率を例10に述べたように計算した。

h u T F 源として、ヒトGM1381細胞溶解物を用いた投与一応答阻害検定からの結果を、第15図に示した。これらの結果は、TF8-5G9抗h u T F 抗体が、 μg 当たり、およそ8-10 ng の抗体濃度でh u T F のこの細胞溶解物の半分の阻害を起こしたことを示している。

20. 非ヒト組織因子とM ϕ A b の交差反応性

組織因子を、豚組織 (ラット、ラビット、子ウシ、イヌ、羊、ブタ及びヒト) 又は、組織培養細胞 (アフリカマドリガル腎臓 (COS) 細胞) から単離した。組織又は細胞を融解し、膜をさき、ミンチし、組織1 μg 当たり、1 μg の酢アセトン中でホモジネートし、ついで、減圧下、ワットマン#1ペーパーで濾過した。この固体をアセトンに懸濁し、もう5回濾過し、一晩空気乾燥したのち、-30℃で保存した。開始濃度量の16~18%を含むアセトン粉末を細かくしてから、5 $\mu\text{mol/L}$ EDT を含む TBS 中、5% (w/v) となるよう懸濁し、室温で1時間混合した。10.000 $\times \text{g}$ 、20℃で、30分間の遠心で固体を集め、ついで、TF含有量を100.000 $\times \text{g}$ 、1時間の上清の遠心で集めた。このペレットを、TBSに懸濁し、-80℃に保存した。

動物TF (TF活性をもつ組織抽出物) による抗体阻害を、次のように測定した。等容量のTF (1 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$) 及びハイブリドーム上清 (TBS/BSAでの10倍希釈物) を、37℃で2時間インキュベートした。残存するTF活性を、そのインキュベ

ーション混合物100 μg を、50 μg のヒト因子Ⅴ欠損血漿及び50 μg の50 mM CaCl₂に添加することにより測定した。37℃で、1分後、相同種の血清の10倍希釈物50 μg を因子Ⅴ源として加え、凝血形成時間を2度測定した。

24個のM ϕ A b のうちの18個がバブーン脳TF又は、アフリカ・マドリガル腎臓細胞抽出物のプロコアグラント活性を阻害した (第8表)。しかし、M ϕ A b のいずれも、ラット、ウサギ、子ウシ、イヌ、羊又はブタのTFと、交差反応を示さなかった。すなわち、相同因子Ⅴ源の存在下、ヒト因子Ⅴ欠損血漿のリカルシフィケーション時間促進能を示すTF調製物ではなかった。抗体のいずれも、正常なヒト血漿での検定による、ウサギTFのコアグラント活性を示さなかった。

第 8 表

| MoAb | イソタイプ | RIA ^a (cpm) | TF ^b TF ^b | バブーン脳 ^c R | 阻害率 ^d % | 動物 ^e Ⅴ ^e | 動物 ^e の阻害 ^e |
|-----------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| TF8-5G4 | IgG1, κ | 6242 | + | ± | 96 | 57 | -- |
| TF8-5G9 | IgG1, κ | 28587 | + | - | 99 | 80 | -- |
| TF8-11D12 | IgG1, κ | 29453 | + | - | 99 | 82 | -- |
| TF9-1F1 | IgG1, κ | 25133 | + | + | 95 | 83 | N.3 |
| TF9-1D5 | IgG1, κ | 3872 | + | + | 95 | 76 | N.3 |
| TF9-1B7 | IgG1, κ | 28586 | + | + | 97 | 90 | N.3 |
| TF9-1B8 | IgG1, κ | 28552 | + | + | 98 | 83 | N.3 |
| TF9-1B9 | IgG1, κ | 28523 | + | + | 97 | 84 | N.3 |
| TF9-2C4 | IgG1, κ | 24435 | + | + | 97 | 78 | N.3 |
| TF9-2F5 | IgG1, κ | 27422 | + | + | 97 | 79 | N.3 |
| TF9-4B11 | IgG1, κ | 25994 | + | + | 97 | 81 | N.3 |
| TF9-5C4 | IgG1, κ | 24073 | + | + | 97 | 83 | N.3 |
| TF9-5B7 | IgG1, κ | 25819 | + | + | 97 | 74 | N.3 |
| TF9-5C7 | IgG1, κ | 24543 | + | + | 96 | 72 | N.3 |
| TF9-6B4 | IgG1, κ | 17894 | + | + | 96 | 98 | N.3 |
| TF9-6C4 | IgG1, κ | 24065 | + | + | 95 | 78 | N.3 |
| TF9-6C9 | IgG1, κ | 8054 | + | + | 95 | 47 | -- |
| TF9-7E10 | IgG1, κ | 8025 | + | + | 97 | 54 | -- |
| TF9-8B3 | IgG1, κ | 29152 | + | + | 97 | 76 | N.3 |
| TF9-9E1 | IgG1, κ | 18169 | + | + | 90 | 71 | N.3 |
| TF9-9C3 | IgG1, κ | 30222 | + | + | 97 | 82 | N.3 |
| TF9-9B4 | IgG1, κ | 33728 | + | + | 95 | 82 | N.3 |
| TF9-10C2 | IgG1, κ | 28682 | + | + | 98 | 71 | N.3 |
| TF9-10H10 | IgG1, κ | 24585 | + | + | 8 | 20 | -- |
| Pab100 | IgG ₁ , κ | 1929 | - | - | 0 | 0 | -- |

モノクローナル抗体 T F 8-5 G 9 による、

種々の細胞及び組織の凝血活性の阻害

| T F 活性源 | T F 活性 (% 阻害) | | |
|--------------------|---------------|-----------|-----------|
| | 抗体なし | Pab100 | TFB-5G9 |
| 精製ヒト T F | 1569 | 1520 (3X) | 245 (84X) |
| 粗抽出物 | 2059 | 2059 (0X) | 411 (80X) |
| 粗胎盤抽出物 | 1287 | 1344 (0X) | 159 (88X) |
| CH1381 繊維芽細胞 (溶解化) | 990 | 965 (2X) | 143 (86X) |
| ヒト単球 (溶解化) | 2893 | 2745 (5X) | 176 (94X) |
| J82 膀胱がん細胞 (溶解化) | 882 | 902 (0X) | 93 (89X) |
| ウサギのトロノボラスチン | 2106 | 2108 (0X) | 2157 (0X) |

1. 精製したヒト T F を、テスト前にリボトビヒクルに再構成した。

2. 右の 2 つの値は、指示されている精製 IgG で処理した後測定した、ミリユニットで表わした凝固 T F 活性の 2 回の平均値が示されている。残存する T F 活性の測定前、サンプルを 37℃ で 20 分間、10 μg / ml の IgG とインキュベートした。カッコ内の値は、抗体なしの同サンプル活性ユニットに対する阻害率が示されている。

21. 因子 V 結合の研究

因子 V / V_a の T F への結合は、機能的 T F : V_a / V_a 凝集促進複合体の集合に必要とされるので、因子 V / V_a の T F に対する結合を妨げることによる、第 8 表に示した M₀ Ab の T F 活性中和能がテストされた。

ヒトの組織因子仲介による、因子 V の J 8 2 の膀胱がん細胞表面への結合はよく調べられている。フェア (Fair) 等、ジャー

ナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、

262 巻、11692 (1987 年)。従って、細胞表面 h u T F : V / V_a 複合体集合に関する M₀ Ab の効果は、J 8 2 細胞を、抗体とブレインキューベートし、さらに、¹²⁵I-因子 V / V_a の特異的結合を定量的に阻害することにより試験した。

22. J 8 2 細胞による因子 X_a 形成の研究

J 8 2 細胞上での h u T F : V / V_a 複合体による因子 X_a 形成速度を、次の修正をした、フェア (Fair) 等 (ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、262 巻、11692 頁 (1987 年)) により報告された、多穴培養プレート検定法を用い 2 度定量化した。細胞を、12 穴プレート中で培養し、J 8 2 細胞への因子 V / V_a 結合の際に上述したように、検定開始前、種々の濃度の精製した、M₀ Ab の IgG 画分と 37℃ で 2 時間ブレインキューベートした。単一の濃度の因子 V / V_a (1 mM) を検定で採用した。因子 X_a を最終濃度 50 μg / ml となるよう添加した後、5、10、15 分の間隔で、50 μl の上清を採取し、550 μl の 50 mM トリス・HCl、2.25 mM Na₂C₂O₄、50 mM EDTA (pH 8.2) の溶液中に入れた。発色性因子 X_a 基質添加 (TXH、ビュート、ヘレナラ社、3.4 mM S-2222 50 μl)、速度論的分析モジュールをつけたベックマン DU-30 分光器で 405 nm の吸光度の増加を測定することにより、因子 X_a の活性を定量化した。因子 V / V_a 非存在下でインキュベートした J 8 2 細胞上清の S-2222 加水分解によるバックグラウンドを各測定値から差し引いた。抗体処理の阻害率は抗体とのブレインキューベーションなしの細胞に対して計算した。

M₀ Ab T F 9-2 C 4 及び T F 9-5 B 7 による J 8 2 細胞

1. 特にことわらないかぎり、全ての結果は、ハイブリドーマ細胞培養上清の 10 倍希釈物を用いて得られたものである。毎分当りのカウント数 (cpm) で表わされているラジオイムノアッセイの結果は、ラクトパーオキシダーゼを使ってラベルした ¹²⁵I-T F を用いている。

2. 還元 (R) 又は非還元 (NR) の T F を用いて行ったウェスタンブロット。

3. 精製したヒトの T F によって誘導されるヒト血漿の凝結の阻害。

4. J 8 2 細胞に対する特異的 ¹²⁵I-因子 V / V_a 結合の阻害。

5. 粗ヒト胎盤抽出物 (B) 又は溶解 COS 細胞 (M) により誘導されるヒト血漿凝集阻害。M₀ Ab が 80% 以上の凝血活性を阻害するとき、文字がその種の場所に入れられている。

種々のヒト細胞及び組織により発現される凝血活性の阻害を M₀ Ab T F 8-5 G 9 を用いて詳細に試験した。T F 8-5 G 9 は、1 g G 濃度 1 μg / ml のときの 90% 以上、精製再純化したヒト T F の機能を中和する (第 16 図)。ヒトの細胞溶解物及び粗胎盤抽出物の凝血活性を阻害する、この M₀ Ab の能力も示されている (第 9 表)。10 μg / ml の IgG 濃度での T F 8-5 G 9 は、粗胎盤及び胎盤のアセトン粉末及び溶解したヒトの繊維芽細胞、膀胱がん細胞及び内毒素活性化末梢血液単核細胞の凝血活性の 80% 以上を定量的に阻害する。

ナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、262 巻、11692 (1987 年)。従って、細胞表面 h u T F : V / V_a 複合体集合に関する M₀ Ab の効果は、J 8 2 細胞を、抗体とブレインキューベートし、さらに、¹²⁵I-因子 V / V_a の特異的結合を定量的に阻害することにより試験した。

J 8 2 細胞を 12 穴培養プレート中、フェア (Fair) 等によって報告されているように (上述)、集量化するまで培養し、バッファ A (137 mM NaCl、4 mM KCl、11 mM Na₂HPO₄、5 mM MgCl₂、5 mM NaHCO₃、10 mM HEPES、pH 7.45) で洗浄し、ついで、精製した M₀ Ab IgG 又は、ハイブリドーマ培養上清 10 倍希釈物を含むバッファ A 0.7 ml とともに、37℃ で 2 時間インキュベートした。塩化カルシウム及び、¹²⁵I-因子 V / V_a を各々、最終濃度 5 mM 及び 1 nM となるよう添加し、さらに 37℃ で、2 時間インキュベートした。その後、細胞単層を、冷バッファ B (140 mM NaCl、0.5% BSA、5 mM トリス HCl、pH 7.45) で 5 回洗浄し、1 ml の 0.2 M NaOH、1% SDS、10 mM EDTA 溶液中で溶解し、その溶解物のガンマ線をカウントした。特異的結合は (非ラベル因子 V / V_a を 100 倍過剰存在下、細胞と混合する ¹²⁵I 因子 V / V_a)、非特異的結合放射活性を差し引いて測定した。特異的結合の阻害率は 9 容のバッファ A と、1 容の培養培地で処理したコントロール細胞に対する、M₀ Ab で処理した J 8 2 細胞という形で測定した。

因子 V / V_a が T F に結合したとき、それはうまく取り込まれないが、抗体結合による T F インターナライゼーションの可能性を除くため、J 8 2 細胞を、5 mM アジ化ナトリウムで代数的に毒殺した。細胞のアジ化処理の有無にかかわらず同じ結果が得られ

の処理に対する阻害効果は、因子Xの形成速度が、因子Ⅲ結合を阻害したものと同様の抗体濃度で阻害されることを示している(第17図)。非阻害的(非中和性)MoAb TF9-10H10は1gG濃度10μg/mlまで、凝血促進活性、因子Ⅲ/Ⅳa結合又は因子Xの生成速度にほとんど影響を与えない。また、コントロールMoAb PA6100は全く効果がない(データ示さず)。

23. huTFhポリペプチドの因子Ⅲ/Ⅳaへの凝合的結合による、J82細胞上での因子X活性化の阻害

当分野ではよく知られているように、凝血促進プロテアーゼカスケードの細胞活性化は、消費性血栓症と呼ばれる種々の病態に関連している。一般に、凝血促進プロテアーゼカスケードは、膜レセプター及び基本的共因子、組織因子(TF)に対する因子Ⅲ/Ⅳaの高い親和性による発見により、細胞表面で開始する。TF及び因子Ⅲ/Ⅳaの二分子凝血促進複合体(TF:Ⅲ/Ⅳa)は、最終的にトロンビン形成及びフィブリンの析出につながる限定したタンパク質分解による因子X及びⅤの活性化を起こす。さらに、凝血におけるTFの役割、TFによる凝血プロテアーゼカスケードの開始は、機械性血管内凝固及びトロンボジェネシスと関連する。ニーマツ(Niemetz)等、ブラッド(Blood)42巻、47頁(1973年)及びベリアクア(Bavliacqua)等、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディスン(J. Exp. Med.)、160巻、618頁(1984年)。TFは、炎症性仲介物に対する応答及び細胞性免疫応答で、単球及び内皮細胞の表面で発現する重要なエフェクター分子である。

本発明のhuTFhポリペプチドが、因子Ⅲ/Ⅳaに結合し、それにより、因子Xを活性化することができる、TF:Ⅲ/Ⅳa

複合体の形成を阻害する能力を研究した。

TBS中、100μMのhuTFhポリペプチド類似物を含む溶液50マイクロリットル(μl)を、96穴平底ポリスチレン検定プレート(各ウェル96個)に入れ、ついでその各ウェルに、例3で述べたように単離した、TBS中1nMの濃度に調整した因子Ⅲ/Ⅳaを含む溶液25μlを加え、さらに、TBS中20mMの塩化カルシウム25μlを加え、その混合物を30分間室温に維持した。

ヒト膀胱がん細胞J82細胞を、アフリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC HTB1;MD州、ロックビル)から入手し、参考としてここに紹介されているフェア(Pair)等の方法(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー、252巻、11692-11698頁(1987年))に従って培養した。

50μlのTBSに5×10⁴個のJ82細胞を懸濁し、上述の維持を行った後、ポリスチレン検定プレートの各ウェルに入れた。その後、ただちに、フェア(Pair)等の報告のように(上述)単離した、TBS中100nMの濃度の因子X25μl及び、X発色基質S-2222(1mg/ml TBS)50μlを加え混合し、その混合物を2分間室温に維持して、発色反応産物を含む検液とした。

生成した発色産物量を、V-max 96穴スペクトロホトメータ(カリホルニア、マウンテン・ビュー、モレキュラー・デバイス社)を用い、405nm(405nm)での光学密度(OD)を測定して定量した。ポリペプチドの代わりにTBSを用いるか、又は、因子Ⅲ無添加のコントロールも測定し最高及び最低OD値を決定した。これら阻害の測定結果を第10表に示す。

第10表

huTFhポリペプチドを用いたJ82細胞に関するX活性化の阻害

| huTFhポリペプチド | 光学密度 ¹ |
|-------------|-------------------|
| PBS | 0.960±0.083 |
| 因子Ⅲ/Ⅳaなし | 0.005±0.001 |
| p1-18 | 1.007±0.087 |
| p1-30 | 1.098±0.028 |
| p11-28 | 0.687±0.071 |
| p24-35 | 0.477±0.011 |
| p26-49 | 0.437±0.020 |
| p40-71 | 0.814±0.053 |
| p72-104 | 0.781±0.047 |
| p94-123 | 0.818±0.055 |
| p121-155 | 0.889±0.067 |
| p144-159 | 0.507±0.053 |
| p146-167 | 0.004±0.001 |
| p157-169 | 0.389±0.035 |
| p161-190 | 0.600±0.023 |
| p190-209 | 0.625±0.031 |
| p204-226 | 0.715±0.042 |
| p244-263 | 0.619±0.047 |

1. もし、光学密度(O.D.)が約0.500以下なら、因子Xの活性化の阻害は有意であると考えた。

本研究の結果は、huTFhポリペプチドp24-35、p26-49、p144-159、p146-167及びp157-169は、因子Ⅲ/Ⅳaに結合し、因子Xを活性化できる、TF:Ⅲ/Ⅳa複合体の形成を阻害することを示している。これらの

結果は、本発明のhuTFh結合部位ポリペプチド類似物が凝血を阻害するのに用いることができることを示している。

24. 抗huTFh MoAbによる凝血の生体内での阻害

しばしば、グラム陰性細菌による腐敗症は、最終的に死に至らしめるショック状態を起こす。このヘモスタシスシステムの乱れは、このショック状態の展開と密接に関連している。テイラー(Taylor)等(ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.)79巻、918-925頁(1987年))は、外的に加えられた活性化した、タンパク質C、天然の抗凝血酵素、は、凝血応答及びヒトにおけるLD₅₀の大腸菌濃度の致命的効果を妨害する。

本発明の抗凝血MoAbの生体内における凝血阻害能力を、テイラー(Taylor)等(上述)によって報告された腐敗ショックのヒビモデルを用いて試験してみた。重さを計った7-8のヒビを実験前一晩絶食し、実験の前、ケタミン(筋肉注射、14mg/kg)で麻酔化した。ついで、ペントバルビタール酸ナトリウムを、経皮カテーテルを通し、鼠の静脈に投与し、軽いレベルの外科的麻酔状態に維持した(約45分毎2mg/kg)。大腸菌静脈を無菌的に露出させ、血液採取の為1方の後足にカニューールを挿入した。経皮カテーテルは大腸菌及び例20で示した、MoAb TF9-5B7を含む試料を与え、ヒトのTFと交差反応させるのに用いた。30分間の平衡化時間の後、この動物に約10分間わたって、MoAb TF9-5B7 500μg/kg又は15μg/kg(例7で述べたように単離し、ついで無菌生理食塩水に透析し、0.58μg/mlの濃度としたもの)又は、無関係のMoAb 500μg/kgを与えた。

MoAb投与及び30分間の平衡化の後、各動物は、LD₅₀。

の大腸菌の投与を受けた。(約10¹⁰個、投与後約8~16時間で敗血症ショックのため死をもたす量である)。大腸菌は2時間に渡り注入により投与した。この研究結果を第11表に示す。

第11表

ヒトの敗血症ショックによる致死の生体内における阻止

| グループ | MoAb | 投与量 μg/kg | 出血 ¹ | 大腸菌 注入 | 死 |
|------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------|-----|
| I. コントロール | TF9-5B7 | 500 | Normal | No | No |
| II. コントロール | HB ² | 500 | Normal | Yes | Yes |
| III. 実験 | TF9-5B7 | 500 | Normal | Yes | No |
| | TF9-5B7 | 150 | Normal | Yes | No |

1. 血圧、凝集活性化及びフィブリン分解産物を含む種々のヘモスタチスパラメータは、M・Ab投与後、大腸菌注入前に測定した。

2. HBは、TF9-5B7と同じ類及び亜種のM・Abであるが、無関係の抗原と免疫反応を起こす。

第11表にみられるとおり、M・Ab TF9-5B7を受けたヒトはLD₅₀の大腸菌の投与に対しても生存しつづけた。MoAb 150 μg/kg及び500 μg/kgの両投与で保護された。さらに、コアグロパシーと関係する、顕著な低血圧、凝集カスケード活性化およびフィブリンの分解は、M・Ab TF9-5B7を受けた動物で著しく緩和された。

25. ヘモグロビン・アルファ鎖としての、58 kDa h u T F ヘテロダイマー鎖鎖の特徴

免疫親和性単離したTFをさらにウェスタン・ブロット分析で特性を調べ、58 kDa h u T F ヘテロダイマーの成分、すなわち、例4で述べた47 kDa及び12.5 kDa タンパク質を同定した。

なるという結論を支持している。

従って、現在、例4で述べられている58 kDa ヘテロダイマーの12.5 kDa 軽鎖成分は、ヘモグロビンのアルファ鎖であり、47 kDa h u T F タンパク質との会合は、h u T F 単離操作のアーテファクトであると考えられている。

例1~25の結果のまとめと討議

2つの異なる細胞融合体由来の、ヒトTFに対する、24種のM・Abライブラリーについて報じられている。各M・Abの免疫特性は、ドットブロット、ウェスタンブロット及びラジオイムノアッセイにより特徴づけられた。ほとんどのM・Abは、全ての3条件下、ヒトの本来のTF及び変性TFと反応した。M・Abの1つ、TF8-5C9は、TFタンパク質のルーチンな精製にうまく使用することができる。それは細胞抽出物由来のTF活性を吸着し、ミリグラム量の精製ヒトTFを一定して与える。

M・Abの1つ以外の全ては、精製したヒトTFの機能活性を強く中和する。いくつかのM・Abは、ヒト及びサルTFと交差反応をすることが分っているが、相同的因子Ⅴの存在下、ラット、ウサギ、子ウシ、イヌ、羊、又はブタのトロンボプラスチンにより開始した因子Ⅴ欠損ヒト血漿の凝集を、どの抗体も阻害しなかった。さらに、ウサギトロンボプラスチンによる正常なヒト血漿の凝集開始は、どの抗体によっても阻害を受けず、このことは、ヒトTF凝集活性の阻害は、因子Ⅴ/Ⅴaを含む、可溶性血漿凝集タンパク質への抗体の妨害によるものではないという結論を支持する。

抗TFによるTF凝集活性の阻害に対する最も明解な原因は、因子Ⅴ/Ⅴa結合のブロックである。予想されるとおり、全部で

例6で述べたように行った。ウェスタンブロット分析を、電気泳動するサンプルとして、例9で述べたように調製した、免疫親和性により単離したh u T F、精製したヒトヘモグロビン、又は、分子量標準を用いて行った。指示されているところではジスルフィド結合の還元のため、サンプルバッファの中に50 mMジチオスレイトールを含めた。ウェスタンブロットを、非免疫化ウサギIgG、従来の方法で調製したウサギ抗h u T F IgG又は、ダコ(Dako)(カリホルニア、サンタバーバラ)社から入手したウサギ抗ヒトヘモグロビンIgGを用いて、示されているように免疫反応した。最初の2つのIgG調製物は、例7で述べたように単離したMAPS-IIである。

上で述べたウェスタンブロット分析の結果は、第18図に示した。抗h u T F IgGは、還元型h u T Fの47 kDaのバンドとのみ免疫反応を起こし、12.5 kDaのバンドとは反応しなかった(パネルA、レーン3)。一方、同IgGは、非還元型h u T Fの58 kDa及び47 kDaの両バンドと免疫反応を起こした(パネルA、レーン4)。これらの結果は、58 kDaヘテロダイマーの47 kDa成分としてのh u T Fの同定と一致している。抗ヘモグロビンIgGは、非還元型h u T Fタンパク中の58 kDaバンドとのみ免疫反応を起こし、47 kDaのモノマーとは反応しなかった(パネルB、レーン4)。しかし、抗ヘモグロビンIgGは、還元型のh u T Fタンパク中の12.5 kDaバンドと免疫反応し(パネルB、レーン3)また、12.5 kDaの精製したヒトヘモグロビン・タンパク質と免疫反応した(パネルB、レーン2)。非免疫化ウサギIgGとの反応はなかった。

上記の結果は、非還元型h u T Fの58 kDaの分子は、ジスルフィド結合でヘモグロビンと結合した47 kDa h u T Fから

23個の抗凝血(中和性)M・Abは、TFの基本的レセプター機能と一致して、J82細胞への因子Ⅴ/Ⅴaの特異的結合を妨ぐ。さらに、このことは、因子Ⅴ結合及び、因子Ⅴa形成速度の阻害のハーブ・マキシマルが同じIgG濃度のときに起こる、選択した精製M・Abの投与決定においても裏付けされる。

ヒトTFに対するM・Abは、最近、カーソン(Carson)等(ブラッド(Blood)、70巻、490頁(1987年))により、これを直接試験したのではないが、因子Ⅴ/Ⅴa結合の妨害によることは明白に、TF活性を阻害するものであると報じられた。24個のここで述べられているM・Abのうちの23個が、TF活性を強く中和するという知見は注目される。種のヒト凝集タンパク質に対するM・Abを用いた当出願者の研究室で行った実験は、少数の割合のものが機能活性を中和するというものである。基本的TFとの交差反応性を含む、反応性が各々異なることから、ハイブリドーマ全てが兄弟クローンであるとは思えない。さらに、進行中のエピトープマッピング研究は、この種のM・Abに少なくとも3つの別々の非結合抗体結合部位が確認されることを示している。それゆえ、TFに対するM・Abを中和する大部分のものは、機能にも関係するわずかな免疫的に優勢なエピトープによるものでもないらしい。事実、ホプ(Hopp)等により(モレキュラー・イムノロジー(Mol. Immunol.) 20巻、483頁(1983年))TFのアミノ酸配列は、多くの抗原決定基を含んでいることが報告されている。

小さいサイズのTFは、なぜ、そんなに多くの抗TF M・Abが因子Ⅴ/Ⅴa結合をブロックするのかを部分的に説明している。TFは、cDNAクローニングにより、グルコシル化を除いて、25 kDaの細胞外ドメインをもつことが予想されている。それ

平成 7.12.20 発行

ゆえ抗体及び因子Ⅷ/Ⅸ分子は、より小さいTFの細胞外ドメインへの結合に立体障害を示しことになる。この立体障害仮説は、TF上の炭化水素鎖がおそらく機能には必要ないことから（ナカムラ（Nakamura）、トロンボヘモステシス（*Throm. Hemost.*）58巻、133頁（1987年））、コンカナバリンノAはTF活性を阻害する（ピトリック（*Pitlick*）ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション（*J. Clin. Invest.*）55巻、175頁（1975年））という観測と一致する。

それは、種々の細胞及び組織により発現した因子Ⅷ依存性止血活性は、同様の機軸をもつ、1つ以上の分子種に寄因するというように、いくらか関連している。しかし、M₀Ab TFⅧ-5C9は組織及び胎盤抽出物及び溶解した組織芽細胞、腫瘍がん細胞及び末梢単核細胞の止血活性を定量的に阻害する。完全ではないが、これらの結果は、現にTFに寄因する細胞性止血活性は、同一ではないときも抗原的に関連しているという結論を支持している。このことは、TFに対する単一の遺伝子がおそらく存在しているという知見と一致している。

最近、敗血症ショックの致死効果は、凝血プロテアーゼカスケードにおいて、中間段階での役割を果たしている抗凝血タンパク質、活性化したタンパク質Cを注入することにより、ヒトにおいて防ぐことができることが示されている。本研究は、TF活性を阻害するM₀Abは、凝血プロテアーゼカスケードの開始のブロックにより、それらが、血管内凝血の病理学的活性化と通常関連している、血漿凝固因子の消費を防ぐので、生体内で、非常に特異性の高い抗凝血剤であることを示している。

例4で述べた58kDa型のh₀TFは47kDaのTFタンパク質と、現在では免疫化学的にまた部分的アミノ酸配列により、

抗TF抗体との反応で観察された。58kDaバンドの一部を含む、これらマイナーな分子種は、TFと他の未特定タンパク質間で形成された、混合ジスルフィド結合物を示している。

特別の態様及び例を含む先の明細は、本発明の説明を意図したものであり、これを限定するものではない。多くの他の変化や、修正が、本発明の精神や範囲を逸脱することなく行うことができる。

ヘモグロビンのアルファ鎖と同一化されている、およそ12.5kDaのポリペプチドの、ジスルフィド結合で結合しているヘテロダイマーであることが示されている。58kDaのヘテロダイマーが、早期の途中で形成されているらしいので、58kDaのバンドは、天然の細胞性TFのヘテロダイマー型であるという以前の提案は誤りであるだろう。

ヘモグロビンのアルファ鎖は、1つのシステインをもち、またTFは、cDNAから、その細胞質ドメインに1つのシステインを有することが予想される。またTFは、細胞外ドメインには4個のシステインをもつが、TF機能が還元により失なわれることから、少なくとも2つが鎖内ジスルフィド結合に使われているはずである。TFの細胞質ドメイン中の1つのシステインは、ほとんどの細胞質ゾルタンパク質中のシステインのように、還元型で維持されているだろう。この（TFの他のシステインは、ありそうもない）システインは、細胞溶解後、混合ジスルフィド形成のため容易にアクセスでき、そして、早期操作間での酸化で、TFの細胞質及びヘモグロビンのシステイン間でジスルフィド結合が形成すると提唱される。この結論は、ヘテロダイマー形成は、明らかに時間依存性があり、脳アセトン粉末由来のTFの昇温活性剤抽出と、免疫親和性マトリックスへの結合との間の時間を小さくすることが、得られるヘテロダイマーTF量を減少させる観測を支持する。推定される96kDaのTFダイマーも、早期の際同様のメカニズムで形成するであろう。

抗ヘモグロビン抗体カラムは、3つの58kDaのヘテロダイマーを特異的に結合したが、免疫親和性で精製したTF調製物中に観察できる高分子量種全てを定量的に除くことはなかった。47kDa以上の分子量をもつ他の血漿のマイナーバンドは、

請求の範囲

- (1) ヒトの組織因子重鎖タンパク質をコードする構造遺伝子を限定する配列を含む、わずかに約12,000ヌクレオチド塩基対を含むDNA断片。
- (2) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の塩基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (3) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約918番の塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(2)記載のDNA断片。
- (4) 上記構造遺伝子が、第1図の約1番から約219番の塩基で表わされるアミノ酸残基配列を有する可溶性ヒト組織因子重鎖タンパク質をコードする、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (5) 上記構造遺伝子が、第2図の、約130番から約786番の塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(4)記載のDNA断片。
- (6) 上記第1の配列の5'末端に連続し、かつ上記タンパク質のアミノ末端に結合した、アミノ酸残基リーグ配列をコードする第2の配列も含み、かつ該第1及び第2のDNA配列がヒト組織因子重鎖前駆体タンパク質をコードする成熟構造遺伝子を定義する、請求の範囲(1)記載のDNA断片。
- (7) 上記成熟構造遺伝子が、第1図の約1番から約263番の塩基で表わされるアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(5)記載のDNA断片。
- (8) 上記成熟構造遺伝子が、第2図の約34番から約918番の塩基で表わされるヌクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(7)記載のDNA断片。

- (9) 上記遺伝子構築遺伝子が、第1図の約32番から約219番の塩基で表わされるアミノ酸塩基配列を有する、可溶性ヒト組織因子重鎖タンパク質前駆体をコードする、請求の範囲(6)記載のDNA断片。
- (10) 上記遺伝子構築遺伝子が、第2図の約34番から約786番の塩基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(9)記載のDNA断片。
- (11) ヒト組織因子重鎖タンパク質をコードする遺伝子を定義する第1のDNA断片に特異的に結合したベクターを含む組換えDNA分子。
- (12) 上記遺伝子構築遺伝子が、第1図の約1番から約263番の塩基で表わされるアミノ酸塩基配列を有するタンパク質をコードする、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (13) 上記遺伝子構築遺伝子が、第2図の約130番から約918番の塩基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (14) さらに、上記第1の断片の5'末端に連結し、かつ上記タンパク質に結合した、アミノ酸塩基配列をコードし、かつ第1及び第2のDNA断片が、上記タンパク質の前駆体をコードする遺伝子構築遺伝子を定義する、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (15) 上記遺伝子構築遺伝子が、第1図の約32番から約263番の塩基で表わされるアミノ酸塩基配列に対応するアミノ酸塩基配列を有する、上記タンパク質の前駆体をコードする、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (16) 上記遺伝子構築遺伝子が、第2図の約34番から約918番の塩基で表わされるスクレオチド塩基配列に対応するスクレオチド

(25)

H-SGTNTVAAYNLTKSTNFKTILEWEPKPV-OH,
H-TKSGDWKSKCFYTTDTEDCDLTDEIVKDVQKTY-OH,
H-XSGDWKSKC-OH,
H-ECDLTDEIVKDVQKTY-OH,
H-LARVTSYPAGNVSTCSAGEFLYENSPFTFYLC-OH,
H-YENSPFTFYLETNLGQPTIQSFQVGTIV-OH, RU
H-QAIVPSRTVNRKSTDSPEVC-OH.

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類似物。

- (26) a) ヒト組織因子重鎖タンパク質と免疫反応し、
b)

H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKC-OH,
H-VFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKT-OH,
H-SSSGKKTAKTNTNFIIDVDKGENYCFSV-OH,
H-SGTNTVAAYNLTKSTNFKTILEWEPKPV-OH,
H-TKSGDWKSKCFYTTDTEDCDLTDEIVKDVQKTY-OH,
H-XSGDWKSKC-OH,
H-ECDLTDEIVKDVQKTY-OH,
H-LARVTSYPAGNVSTCSAGEFLYENSPFTFYLC-OH,
H-YENSPFTFYLETNLGQPTIQSFQVGTIV-OH, RU
H-QAIVPSRTVNRKSTDSPEVC-OH; RU

からなる群から選ばれた式で表わされるポリペプチドと免疫反応し、かつ

- c) 第1図の第204番から第226番の部位で示される式で表わされるポリペプチドと実質的に免疫反応しない。

抗体分子を含む、抗体組成物。

- (27) 上記抗体がラベルに結合している、請求の範囲(26)記載の組成物。

- ド塩基配列を有する、請求の範囲(15)記載の組換えDNA分子。
- (17) 上記ベクターが上記第1及び第2のDNA断片の複製を促進しうる、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (18) 上記ベクターが、宿主細胞中、上記タンパク質を発現しうる、請求の範囲(11)記載の組換えDNA分子。
- (19) 上記ベクターが、宿主細胞中、上記前駆体タンパク質を発現しうる、請求の範囲(14)記載の組換えDNA分子。
- (20) 上記ベクターが、pKSV-10であり、かつ、上記遺伝子構築遺伝子が、可溶性の上記前駆体タンパク質をコードし、かつ、第2図の34番から786番の塩基で表わされるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲(19)記載の組換えDNA分子。
- (21) わずか約50アミノ酸塩基を含み、かつ、

-VNRQVTVQIST-OH, RU

-LYWKSSSSGKKT-OH

からなる群から選ばれた式で表わされる配列に対応するアミノ酸塩基を含む、ヒト組織因子結合部位ペプチド類似物。

- (22) 上記ポリペプチドが、式:

H-VNRQVTVQIST-OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

- (23) 上記ポリペプチドが、式:

H-LYWKSSSSGKKT-OH

で表わされる、請求の範囲(21)記載のポリペプチド。

- (24)

H-EPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKC-OH,
H-VFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKT-OH, RU
H-SSSGKKTAKTNTNFIIDVDKGENYCFSV-OH.

からなる群から選ばれた式で表わされるヒト組織因子結合部位ポリペプチド類似物。

- (28) 上記抗体が、生理学的に許容しうる希釈剤中に存在する、請求の範囲(26)記載の抗体組成物。

- (29) ヒト組織因子重鎖タンパク質及び第1図の26番から49番の塩基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF8-5G9と命名されたハイブリドーマ。

- (30) 請求の範囲(29)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

- (31) ヒト組織因子重鎖タンパク質及び、第1図の第26番から第49番の塩基で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-10H10と命名された、ハイブリドーマ。

- (32) 請求の範囲(31)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

- (33) ヒト組織因子重鎖及び、第1図の第146番から第167番で示される式で表わされるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、TF9-6B4と命名した、ハイブリドーマ。

- (34) 請求の範囲(33)記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

- (35) a) 身体サンプルを、ヒト組織因子重鎖タンパク質と混合し、免疫反応混合物を作る;

b) この混合物を、上記抗体がサンプル中に存在するヒト組織因子と免疫反応し、免疫反応物を形成するのに十分な時間維持する、そして、

c) ステップb) で生成した免疫反応物の存在を決定する、以上、a) ~ c) のステップを含む、身体サンプル中のヒト組織因子重鎖タンパク質の存在を決定する方法。

平成 7.12.20 発行

- (35) a) 生理学的に許容しうる希釈剤及び、血柱中に存在するヒト組織因子と効率よく免疫反応する、生体内指示手段と結合した、ハイブリドーマ T F 9-10 H 10 によって産生される、ある量の抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物を被検者に静脈投与する。
- b) 上記投与を受けた被検者を、上記抗体分子が、血柱の一部として生体内に存在する組織因子と免疫反応し、免疫反応産物を形成するのに十分な、予め決められた時間維持する。そして、

c) ステップ b) で生成した免疫反応産物の存在を決定する、以上、a) ~ c) のステップを含む生体内の血柱を検出する方法。

- (37) 存在するヒト組織因子と効率よく結合する、T F 8-5 G 9 及び T F 9-5 B 4 からなる群から選ばれたハイブリドーマによって産生される、ある量の抗体分子を含有する生理学的に許容される希釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈投与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝固因子Ⅳ/Ⅴ a への結合能を中和する方法。

- (38) 組成物中、因子Ⅳ/Ⅴ a と効率的に結合する量の、

H-EYKPVNQQVTVQISTKSGDWSXC-OH,
H-VFGKDLITLYWSSSGKKT-OH, 及び
H-SSSGKKTAKTNTNTEFLIDVDKGEHYCTSV-OH。

からなる群から選ばれたポリペプチドを、含有する生理学的に許容された希釈剤を含むポリペプチド組成物を被検者に静脈投与することを含む、生体内におけるヒト組織因子の凝固因子Ⅳ/Ⅴ a への結合を阻害する方法。

- (39) a) 請求の範囲 (22) 記載の抗体組成物を含有するパッケージ

請求の範囲 (42) 記載の組成物。

- (46) a) 少なくとも 1 回の検定を行うのに十分な量の、実質的にヒト組織因子凝固タンパク質を含まない、生物学的活性のあるヒト組織因子凝固タンパク質の水溶液を含有する組成物を含むパッケージ。

を含む血管システム液体サンプル中での凝固能を決定するキットの形をした診断システム。

- (47) 上記凝固タンパク質がリン脂質中に分散している、請求の範囲 (46) 記載の診断システム。

- (48) 上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第 1 図の第 1 番から第 219 番の部位で変えられるアミノ酸残基配列を有する、請求の範囲 (46) 記載の診断システム。

- (49) a) ヒト組織因子凝固タンパク質をコードする構造遺伝子を定義する第 1 の DNA 断片及び、第 1 の DNA 断片と連続しており、かつ上記タンパク質に結合する、アミノ酸残基リダー配列をコードする第 2 の DNA 断片で、該第 1 及び第 2 の DNA 断片合せて上記タンパク質の前駆体をコードする構造遺伝子を定義している DNA 断片と機能的に結合する、ホ乳細胞に適合する発現ベクターを含む組換え DNA 分子でトランスホームしたホ乳細胞の栄養増地で培養を開始する。

b) 上記培養物を上記細胞が上記組換え DNA 分子由来のタンパク質を発現し、かつ、上記成熟タンパク質を形成するのに十分な時間、維持する。そして

c) 上記培養物から、上記成熟タンパク質を回収する。

以上、a) ~ c) のステップを含む、成熟ヒト組織因子凝固タンパク質の調製方法。

を含むサンプル中に存在するヒト組織因子凝固タンパク質の存在を決定するための、キットの形をした診断システム。

- (40) 上記モノクローナル抗体分子を含む上記抗体組成物が、

a) T F 8-5 G 9、

b) T F 9-5 B 4、

c) T F 9-10 H 10

からなる群から選ばれたハイブリドーマにより産生される、請求の範囲 (39) 記載の診断システム。

- (41) a) サンプルを、固体マトリックスに固定した、請求の範囲

(15) 記載のポリペプチドを含む固体サポートと混合し、結合反応混合物とする、

b) 上記結合反応混合物を、上記凝固因子が上記ポリペプチドと結合し、固相複合体及び上清を形成するのに十分な時間維持する、

c) 上記複合体から上記上清を分離する、及び

d) ステップ c) の分離した複合体から、上記凝固因子を回収する、

以上、a) ~ d) のステップを含む、サンプルから血液凝固因子Ⅳ/Ⅴ a を分離する方法。

- (42) 実質的に、ヒト組織因子凝固タンパク質を含まない生理学的活性のあるヒト組織因子凝固タンパク質の水溶液を含む組成物。

- (43) 上記生物学的活性のあるヒト組織因子凝固タンパク質を、リン脂質中に分散させた、請求の範囲 (42) 記載の組成物。

- (44) 上記溶液が、非イオン性界面活性剤を含む、請求の範囲 (42) 記載の組成物。

- (45) 上記タンパク質が可溶性であり、かつ、第 1 図の第 1 番から第 219 番の部位で変えられるアミノ酸残基配列を有する、請

- (50) 上記構成構造遺伝子が、第 2 図の第 34 番から第 786 番の塩基で変えられるスクレオチド塩基配列を有する、請求の範囲

(49) 記載の方法。

- (51) 請求の範囲 (49) 記載の方法により産生した、成熟ヒト組織因子凝固タンパク質を基本的に含む組成物。

- (52) 請求の範囲 (50) 記載の方法により産生した成熟ヒト組織因子凝固タンパク質を基本的に含む組成物。

- (53) ハイブリドーマ T F 8-5 G 9 により産生される抗体分子を、投与時間内に存在するヒト組織因子と効率よく結合できる量含有する、生理学的に許容された希釈剤を含む、モノクローナル抗体組成物を、被検者に静脈投与することを含む、ヒト組織因子の、凝固開始能を中和する方法。

- (54) ヒト組織因子凝固タンパク質及び、第 1 図の第 26 番から第 49 番の残基で示される式で変えられるポリペプチドと免疫反応する抗体分子を産生する、T F 9-5 B 7 と命名されたハイブリドーマ。

- (55) 請求の範囲 (54) 記載のハイブリドーマにより産生される抗体分子を含むモノクローナル抗体組成物。

- (56) ハイブリドーマ T F 9-5 B 7 により産生される抗体分子を含有する生理学的に許容された希釈剤を含む治療に効果的な量のモノクローナル抗体組成物を、被検者に投与することを含む、ヒト組織因子の凝固開始能を中和する方法。

- (57) a) ヒト組織因子凝固タンパク質と免疫反応し、それにより、凝固タンパク質の因子Ⅳ/Ⅴ a への結合能を阻害し、かつ

b) h u T F 8: Ⅳ/Ⅴ a 複合体と免疫反応し、それにより、該複合体の因子 X 活性化能を阻害する抗体分子を含む治療的に効果的な量の、抗凝固モノクローナル抗体組成物を投与

平成 7.12.20 発行

することを含む凝血を阻害する方法。
 (58) 上記抗体分子がさらに、ヒト組織因子と免疫反応を起こすこ
 とを特徴とする、請求の範囲(57)記載の方法。

FIG. 3

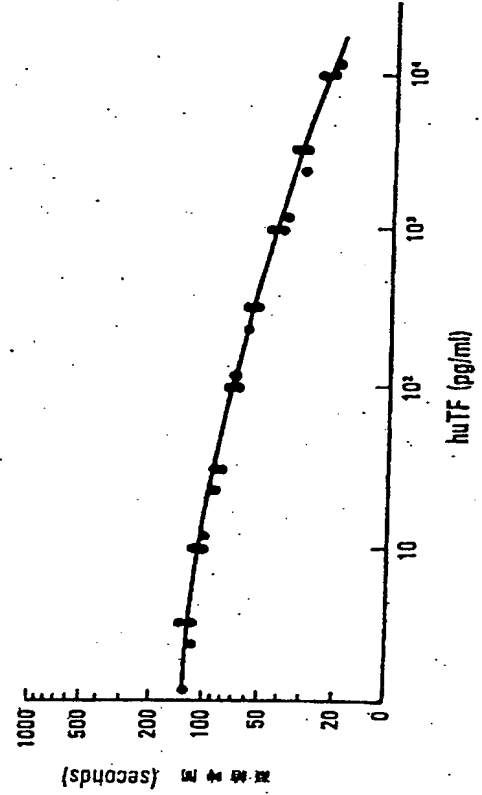


FIG. 9
 リン脂質化TFペプチドによる
 TF因子の活性化の阻害

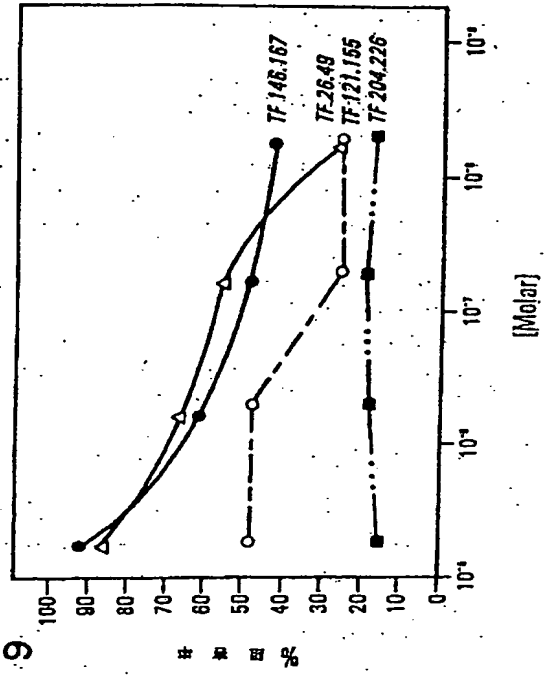
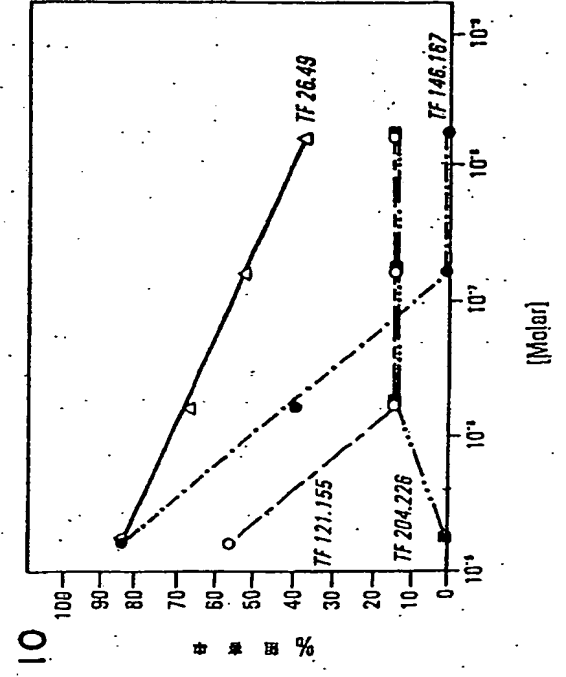
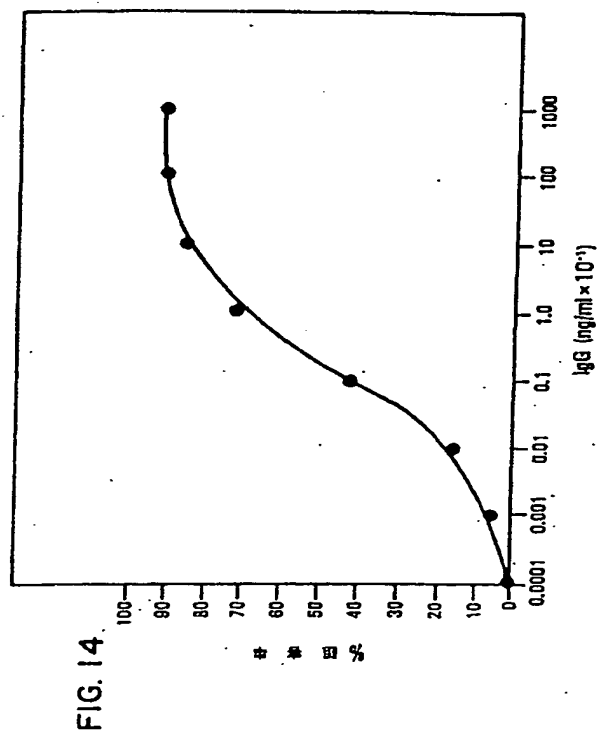
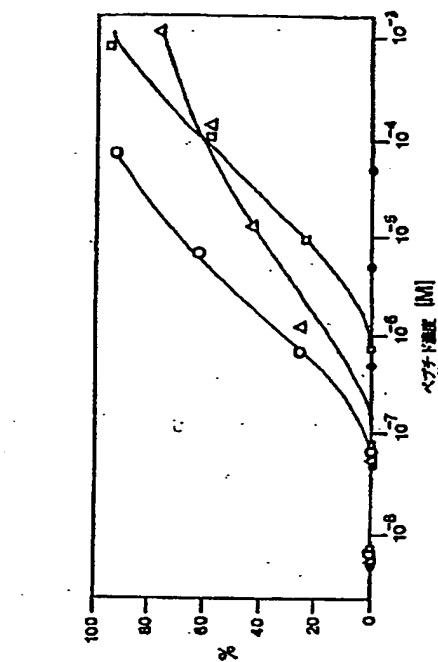
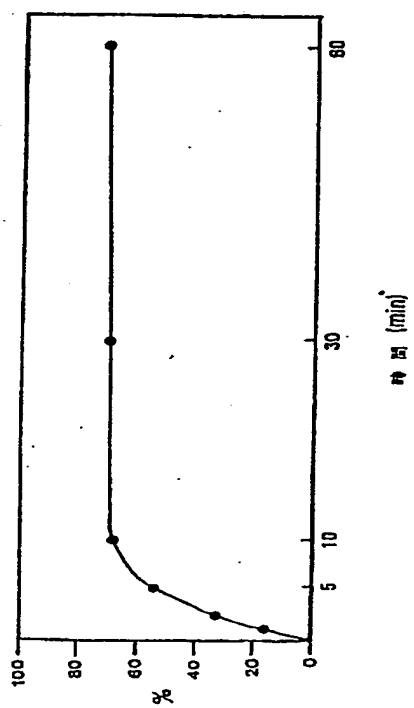
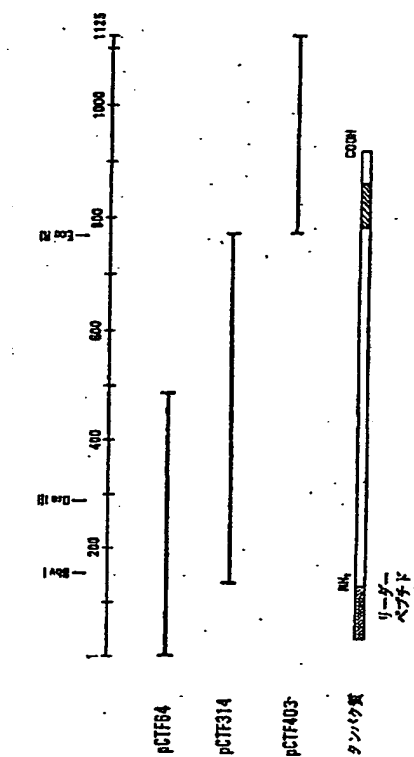


FIG. 10
 リン脂質化TFペプチドによる
 因子の活性化の阻害





平成 7.12.20 発行

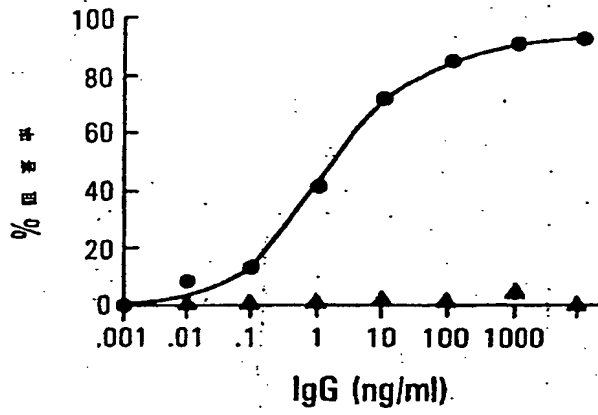


FIG. 16

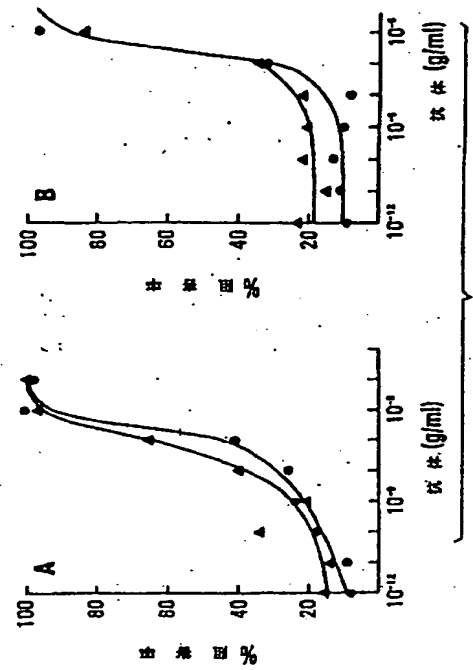


FIG. 17

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

MS Page Blank (usps)